目　　录

第1章　绪　　论

1.1　发展历史……（1）
1.2　生物有机化学的内容……（2）
1.3　细胞化学与体外化学的关系……（3）
1.4　酶反应的立体化学……（10）
1.4.1　潜手性氢原子和潜手性面……（10）
1.4.2　酶和非酶反应的立体化学差异……（11）
1.4.3　酶的立体专一反应的例子……（13）

第2章　氨基酸和多肽的生物有机化学

2.1　氨基酸的结构特征与生物功能……（16）
2.2　生物体内的肽键化学……（26）
2.3　非核蛋白体的肽键生物合成……（35）
2.4　神经肽化学……（42）
2.5　化学突变……（49）
2.5.1　位置-定向诱变(点突变)……（51）
2.5.2　化学特变和半合成酶……（52）

第3章　磷酸酯和核苷酸的生物有机化学

3.1　结构和性质……（57）
3.1.1　嘌呤和嘧啶碱基……（58）
3.1.2　糖环的构象……（59）
3.1.3　碱基与糖环的关系……（60）

3.2 单核苷酸……（61）
3.2.1 ATP……（61）
3.2.2 cAMP和cGMP……（65）
3.3 磷酸酯的水解……（68）
3.4 生物合成磷酸二酯键的化学及抑制药物……（79）
3.5 DNA 的嵌入剂……（84）
3.6 作为催化剂的 RNA 分子……（94）

第4章 酶化学

4.1 催化作用……（98）
4.2 酶的催化作用……（102）
4.2.1 与酶的高效性有关的因素……（103）
4.2.2 分子内的催化作用……（105）
4.2.3 多功能催化作用及简单模型……（106）
4.3 α-糜蛋白酶……（109）
4.3.1 电荷传递体系的模型实验……（115）
4.3.2 结合底物的绝对构象……（117）
4.4 溶菌酶……（122）
4.5 水解反应中的立体电性控制……（125）
4.5.1 原酸酯的水解……（126）
4.5.2 立体电性控制理论对丝氨酸蛋白酶的应用……（130）
4.6 酶在合成有机化学中的应用……（137）
4.7 过渡态类似物……（141）
4.8 抗体酶……（146）

第5章 酶模型

5.1 主-客体配位化学……（152）
5.1.1 大环和穴状化合物的效应……（161）
5.1.2 手性识别与催化……（163）
5.1.3 立体选择运输……（167）

5.1.4 离子载体 …… (169)
5.2 冠醚化学的新发展 …… (171)
5.2.1 含氮冠醚与大环聚胺 …… (173)
5.2.2 套索冠醚 …… (179)
5.2.3 pH调节作用和离子选择性 …… (182)
5.2.4 双冠醚 …… (185)
5.2.5 光敏冠醚 …… (189)
5.2.6 球状配体 …… (193)
5.3 膜化学和胶束 …… (201)
5.3.1 立体化学识别 …… (207)
5.3.2 膜模拟的进展 …… (210)
5.4 聚合物 …… (214)
5.5 环糊精 …… (219)
5.5.1 新的生物模型 …… (227)
5.6 酶体模板 …… (231)
5.7 远程功能基化反应 …… (236)
5.7.1 其它有关的仿生合成 …… (238)
5.8 仿生多烯环化 …… (244)

第6章 辅酶的化学

6.1 NAD^+ 和 $NADP^+$ …… (253)
6.1.1 模型化合物 …… (256)
6.1.2 辅酶的非酶再循环及在有机合成中的某些应用 …… (260)
6.2 FAD …… (262)
6.2.1 FAD 参与的加氢-脱氢反应 …… (262)
6.2.2 FAD在单加氧酶反应中的作用 …… (267)
6.3 硫辛酸 …… (273)
6.4 磷酸吡哆醛 …… (276)
6.4.1 结构与功能 …… (280)
6.4.2 自杀性酶失活剂 …… (285)

6.5 硫胺素焦磷酸酯(TPP) …… (291)
6.6 生物素 …… (296)

第7章 金属离子

7.1 蛋白质和生物分子中的金属离子 …… (310)
7.2 Zn^{2+}在碳酸酐酶中的作用 …… (312)
7.3 羧肽酶A与Zn^{2+} …… (313)
7.4 铁与氧的运输 …… (319)
7.4.1 运输氧的载体——携氧蛋白质 …… (319)
7.4.2 血红蛋白的结构与功能 …… (320)
7.4.3 携氧蛋白质调节氧亲合力的模型 …… (322)
7.4.4 细胞色素P-450的模型 …… (337)
7.5 钴和维生素B_{12}的作用 …… (340)
7.5.1 维生素B_{12}的结构 …… (340)
7.5.2 维生素B_{12}在变位酶中的作用 …… (342)
7.5.3 催化过程中的重排机理 …… (350)
7.5.4 自然界中的汞污染与VB_{12}的转甲基化作用 …… (362)
7.6 氨基酸的酯、酰胺和肽的水解 …… (356)
7.7 硒与生物体的关系 …… (363)

第1章 绪 论

1.1 发展历史

虽然自然科学家很早就关心和涉及生命系统的发展和行为，但是只是从 20 世纪起，研究者们才在分子水平上去研究生物环境中有机组织的内部行为。20世纪中叶，很多天然产物的结构和功能被确定，复杂的生物合成反应甚至在非酶的实验室开始被重视。因而，“生物有机化学”这个名词开始被大家提及得越来越多。

从20世纪60年代起，很多有机化学家已感觉到，有机化学长远的发展方向是与生命现象相结合，解决生物化学中的问题。将来的有机化学家也同时是生物化学家；反之，生物化学家也是有机化学家，两者合二为一。因而“生物有机化学”开始成为有机化学中的一个新分支。在这个新领域中，有机化学家是对一些与生物有关的天然产物的化学感兴趣。他们是用有机化学和物理有机化学的原理和手段，采取分子模型的方法，研究体内的生化过程；了解酶的作用机理，酶那么高效、专一的原因，探索生命现象的奥秘；此外，他们要在没有酶的情况下，实现体外反应的高效、专一，进行人工酶的合成。

1972年，《生物有机化学》杂志开始出版，它标志了生物有机化学领域已进入活跃的研究阶段。有机理论的发展(尤其是反应机理)、物理有机化学中动力学的研究、同位素标记方法的应用、X-射线结晶结构分析以及光谱等结构测定方法的建立，都为酶学，也为生物有机化学的发展提供了极好的背景和工具。

从20世纪60年代末到70年代中，“仿生合成”(biomimetric syntheses) 工作已有广泛开展。在人工酶的合成方面已有冠醚、微团（胶束）、环糊精、多聚体及笛体等多种类型出现，在这些模拟酶的母体或模板上，不仅能连结催化基团（包括辅酶），而且有手性识别能力。虽然，离开合成出与天然酶可媲美的“人工酶”的要求还有很大距离，但是，这样的途径肯定会给最终实现这个目标奠定良好的基础。在这里，Pedersen、Cram 和Lehn 三人在主-客体化学（host-guest chemistry）及超分子化学（supermolecular chemistry）方面的卓越成就令人瞩目，为此，他们获得了1987年诺贝尔化学奖。

80年代，生物有机化学领域突破性的发展是核酸性酶（ribozyme）和抗体酶(abzyme)的发现。它们打破了传统“酶”的概念，对于生命的起源、基因工程和免疫化学的应用前景都起了极重要的作用，使“生物有机化学”领域成为更加充满活力和有希望的领域。

1.2 生物有机化学的内容

蛋白质和核酸是生命现象的基础。因此，这两个领域的发展也是生物有机化学的基础，虽然我们的直接对象是酶及其所进行的生命活动。为此，我们首先要介绍有关这两类物质的生物有机化学，其中也包括一些基本化学特性。酶是进行生命活动的重要因子。虽然目前在结构和作用机理方面完全弄清楚的酶并不多，但通过已有工作的介绍也会给我们不少启示，为今后其它酶的研究及人工酶的设计提供了方法和资料。辅酶和金属离子是全酶发挥作用时不可少的辅助因子，也是在化学性质方面极为活跃的部分。由于它们结构明确，因而对于了解作用和结构之间的关系，提供了较为可靠的资料。“酶的模型”是生物有机化学中重要内容，是实现“人工酶”的基础工作。介绍这方面的内容将有助于

了解合成“模拟酶”的设想、原理、方法和评价标准。

在从事生物有机化学工作的实验室里有两套人马。一部分人从事分子模型合成，这是有机合成化学家的工作。但只有这方面的人才是不够的，因为“合成什么模型化合物？”必须由生物化学者的资料提供依据，合成后的化合物也需经生化方法进行评价。因此必须有另一部分人即生物化学家，利用生化手段如酶的纯制、鉴定、同位素示踪等了解体内的生化过程。当然，只靠生物化学家的工作也是不行的，因为体内酶与底物之间的作用往往是很快的，虽然目前有低温冷冻技术，但由于体内的过程常是多因素同时起作用，问题较为复杂，所以在体外利用模型化合物进行单因素的研究，仍是很必要的。为此，生物有机化学的工作需要生物化学、有机合成化学和物理有机化学等多学科共同协作进行，为实现“揭示生命奥秘”和“合成人工酶”的目标，需要多学科的共同努力。

1.3 细胞化学与体外化学的关系

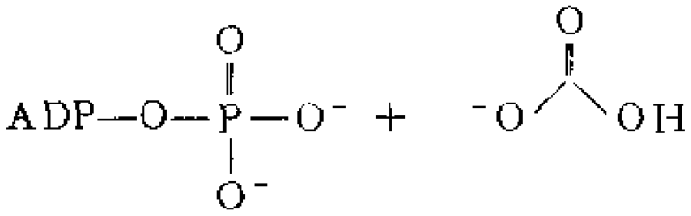
细胞内的化学反应虽然与体外化学在具体条件上有较大差别，例如体内的生化反应都是在37℃，接近中性的环境及有生物催化剂——酶的存在下进行；而体外的反应常需加热、加酸碱催化，有的甚至需加压。但是，通过从分子水平对体内反应的研究结果表明，它们共同遵循着很多化学规律，例如分子大小和形状的结构影响，功能基的化学、酸碱性、能量改变原则、反应速率等影响因素。而且，体内发生的化学反应同样是寻找“最佳”的反应途径，和体外反应有很大的类似性。现列举体内由乙酰辅酶A开始合成软脂酸的例子，说明这种类似性的普遍性。

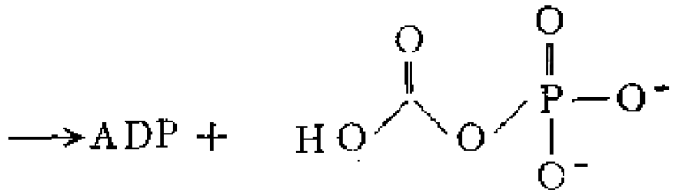
在软脂酸合成中所需的8个乙酰辅酶A中，只有一个以乙酰辅酶A的形式参与合成，其余7个都是以丙二酸单酰辅酶A的形式进行反应的。丙二酸单酰辅酶A是由乙酰辅酶A和HCO_3^-在

ATP 存在下生成的，这也是软脂酸合成的第一步（以下各步均略去参与催化的酶）：

（1） $CH_3CO\text{-}S\text{-}CoA + HCO_3^- + ATP \longrightarrow HOOCCH_2CO\text{-}S\text{-}CoA + ADP + Pi$

这里，ATP的作用是活化 HCO_3^-，使后者成为活性形式——磷酸和HCO_3^-的混合酸酐，ADP 是作为良好的离去基团离去。





$$\underline{CH_3CO\text{-}S\text{-}CoA} \rightarrow HOOCCH_2CO\text{-}S\text{-}CoA + Pi$$

乙酰辅酶A中乙酰基的α-H是有酸性的氢原子，因此，在酶作用下可形成α-碳负离子，发生亲核的加成反应（类似Claisen缩合反应）。乙酰辅酶A中的硫酯键的羰基是较好的亲电试剂，因此，乙酰辅酶A（包括其它酰基辅酶A）都是良好的酰化试剂。反应（2）和（3）是由乙酰辅酶A和丙二酸单酰辅酶A都将酰基转移给酰基载体蛋白——一种具有类似辅酶A的辅基的小分子蛋白质（ACP-SH）。这些转移过程相当于巯基进行的酰化反应：

（2） $CH_3COS\text{-}CoA + ACP\text{-}SH \longrightarrow CH_3COS\text{-}ACP + CoA\text{-}SH$

（3） $HOOCCH_2COS\text{-}CoA + ACP\text{-}SH \longrightarrow HOOCCH_2COS\text{-}ACP + CoA\text{-}SH$

在反应（4）中，乙酰-S-ACP与丙二酸单酰-S-ACP缩合，给出四碳的酰基链。

（4） $CH_3COS\text{-}ACP + HOOCCH_2CO\text{-}S\text{-}ACP \longrightarrow$
$CH_3COCH_2COS\text{-}ACP + CO_2 + ACP\text{-}SH$

此步反应非常类似体外的丙二酸二乙酯合成法，即丙二酸单酰-S-ACP形成α-碳负离子后与乙酰-S-ACP进行加成，然后消除失去ACP-SH。由于此时具有β—羰基酸的结构特征，因而 CO_2 同时失去（脱羧）是不足为奇的。这里的CO_2就是开始提供的 HCO_3^-，因此后者实际只起了催化作用，通过以上步骤形成了C-C键。此后各步都是实验室中熟知的：（5）羰基还原成醇羟基；（6）醇脱水成烯；（7）双键氢化。第（5）、（7）两步的还原剂都是NADPH

（5） $CH_3COCH_2COS\text{-}ACP \xrightarrow{\text{还原}} CH_3CHOH\text{-}CH_2COS\text{-}ACP$

（6） $CH_3CHOH\text{-}CH_2COS\text{-}ACP \xrightarrow{\text{脱水}} CH_3CH{=}CH\text{-}COS\text{-}ACP$

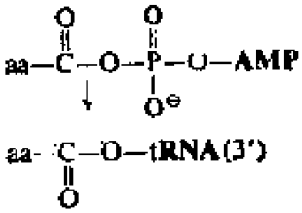
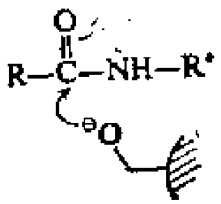
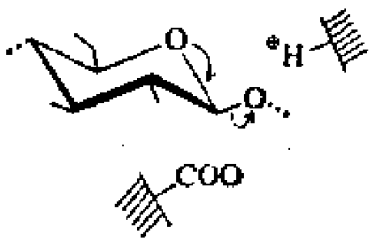
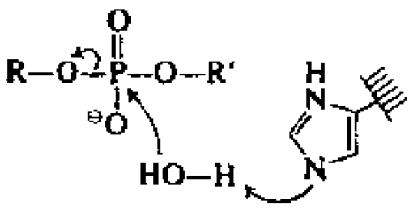
（7） $CH_3CH{=}CH\text{-}COS\text{-}ACP \xrightarrow{\text{还原}} CH_3CH_2CH_2COS\text{-}ACP$

此后，丙二酸单酰-S-ACP与以上四碳化合物进行反应，重复循环反应（4）—（7）各步，每次增加2个碳原子，经7次循环后，可得到含16个碳的软脂酸酰硫酯-ACP，再经硫脂酶催化水解，即形成游离的软脂酸。多数生物的脂肪酸合成步骤仅限于形成软脂酸。硬脂酸及其它不饱和酸的形成尚需再经其它途径。

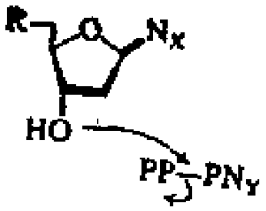
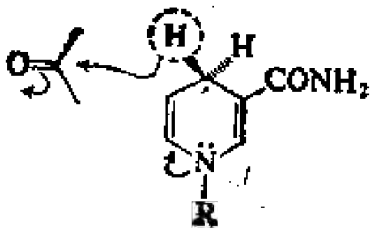
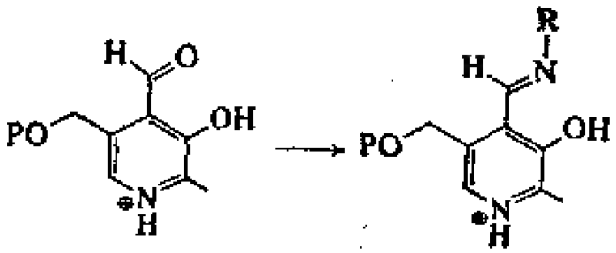
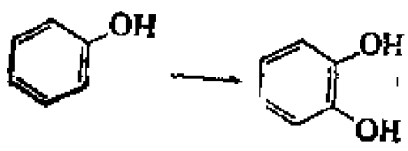
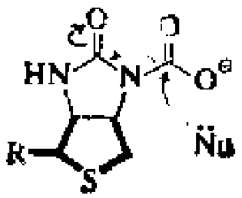
由以上各步反应的化学可以看出，酶所催化的反应酷似反应器中的反应。这种类似性也正是生物有机化学研究的基础和目

标。用体外有机化学的理论研究体内的细胞反应；用体内细胞反应的特点启发体外的合成反应，实现体外反应的非酶高速、专一化。在表 1-1 中列出本书中所涉及的某些体内外反应之间的对照表，以及在表 1-2 中列出了某些辅酶所涉及的化学。

表1-1　某些酶促反应与体外反应的比较

酶促反应	反　应　式	体外相应反应
核蛋白体上的多肽合成，ATP的活化，氨酰-t-RNA的形成		酰胺键的合成，经 DCC 的活化，固相合成，立体调节（模板）的表面
蛋白酶，多肽键的水解，α-糜蛋白酶(经Asp—His—Ser 电荷中断)，羧肽酶 (Zn^{2+}, Glu)		酰胺键被碱断裂，亲核试剂
多糖的水解，溶菌酶		在酸性介质中缩醛的水解，C—O键的断裂
磷酸二酯键的水解，RNA水解酶 (2His, Lys)		P—O键的断裂，伪旋转 (Pseudorotation)

续表

酶促反应	反　应　式	体外相应反应
磷酸二酯键的形成，RNA和DNA聚合酶，三磷酸核苷酸		P—O键合成，经 DCC 的活化
氧化还原反应，脱氢酶 NADH ⇌ NAD⁺		氢负离子转移，HB_4^-
吡哆醛磷酸酯参与的反应		Schiff 碱的形成，脱羧反应，消旋化
依赖FAD和 O_2 的氧化反应		羟基化反应，氧的插入反应，类似 O_3 的中间体
依赖生物素羧化（或二羧化）的酶"活性CO_2"		CO_2 的加成，C—C 键的形成，类似DCC的中间体

续表

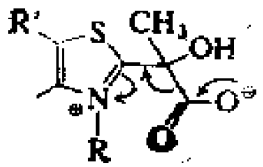
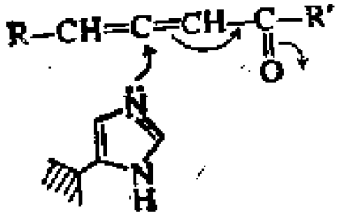
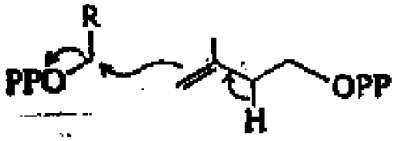
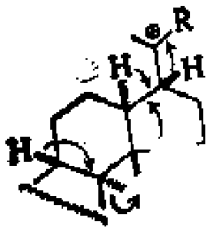
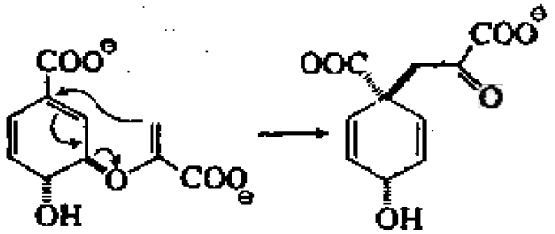
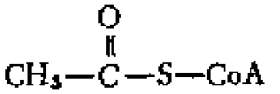
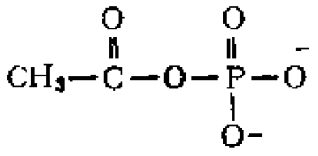
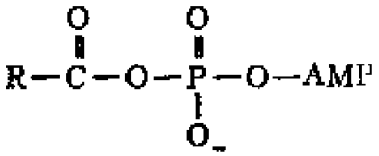
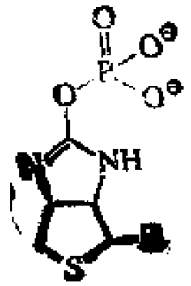
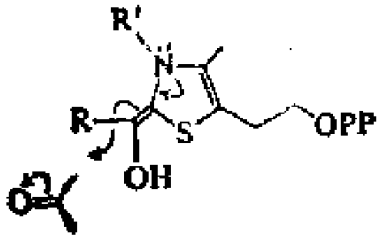
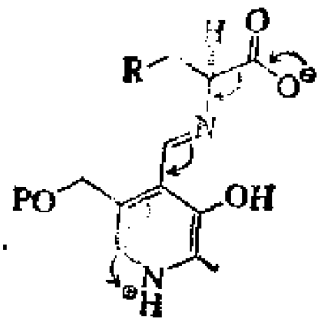
酶促反应	反　应　式	体外相应反应
依赖硫胺素焦磷酸酯的脱羧酶，"生物氰根离子"		α—羰基酸的还原脱羧，安息香缩合
"自杀性"酶的失活剂		Michael 加成，共价键的不可逆形成
萜的生物合成		C—C 键的形成，烯烃的加成
甾体的生物合成，H^- 和 CH_3^- 的迁移、环的重排		在酸性介质中的 Wagner-Meerwein反应
芳香族氨基酸的生物合成链的迁移	 分支酸盐　预苯酸盐	Claisen重排〔3，3〕σ移位
依赖VB_{12}的反应	$CH_3-\underset{\displaystyle OH}{\underset{\vert}{CH}}-CH_2OH \longrightarrow CH_3CH_2CHO$	共价键的 1，2-迁移

表1-2 某些辅酶涉及的化学

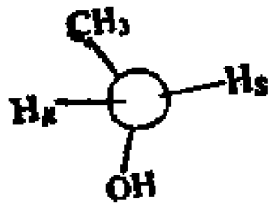
类　型	结　构　式	涉及的化学
乙酰—CoA，硫酯		双重角色（α-H的酸化；酰化剂）
乙酰磷酸酯		类似酸酐的中间体
ATP，氨基酸活化		活化氨基酸的酸酐中间体
生物素磷酸酯中间体		类似酸酐或 DCC 反应类型的中间体及化学
硫胺素焦磷酸酯		电子陷井
吡哆醛磷酸酯		电子陷井

1.4 酶反应的立体化学

立体专一性是酶催化反应的特点之一。立体化学的结果能对酶-底物复合物的结构提供重要信息，例如与底物有关的催化基团的位置、反应过程中底物或中间体的构象或构型等。这里我们将对与体内反应有关的立体化学基础及某些例子作一介绍。

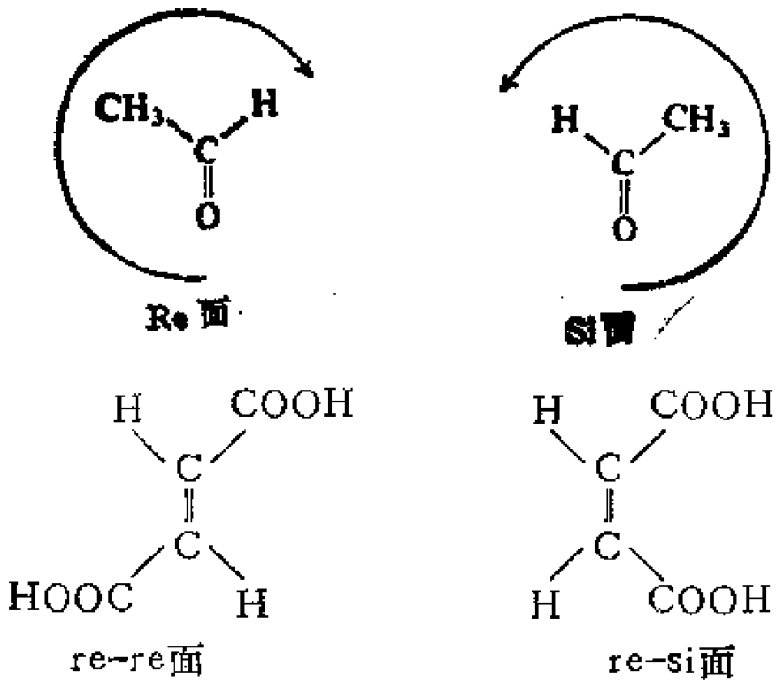
1.4.1 潜手性氢原子和潜手性面

“手性”的概念在基础化学中已提到。作为生物学有兴趣的有机分子很多都具有手性，如组成蛋白质的氨基酸是具有光学活性的物质（除甘氨酸）、与羧基、氨基、氢及烷基相连的α—碳是手性中心（碳）。对于来自 $CR_2R'R''$ 结构类型的碳，称为潜（前）手性碳（prochiral carbon）。虽然此类结构的分子本身是无光学活性，但可通过使两个相同的R基团换成不同的基团的操作，使分子具有手性。例如，在乙醇中的亚甲基碳可称为潜手性碳原子。当连在此潜手性碳上的两个氢原子有一个被氘置换后，即可生成手性的醇。因此，这两个氢原子称为潜手性氢原子。潜手性氢原子的标定方法如下：当此氢原子被氘置换后，按照Cahn-Ingold-Prelog 构型标定规则，得到R-构型产物时，此氢原子称为潜手性R-氢，可用pro-R氢或 H_R表示；同理，若得S-构型产物，则称为pro-S氢或 H_S。H_R 和 H_S又可称为对映异构的氢（enantiotopic hydyogen）。



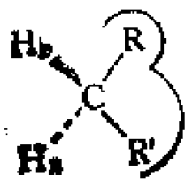
对于含有三角形的SP^2杂化碳原子的化合物，如羰基化合物和烯烃等含双键的化合物，重键的两个面是等同的。但是在生物体内与酶结合后就可成为手性面。这样原SP^2杂化碳原子也可称为潜手性碳；两个面可称为潜手性面。标定潜手性面时需先确定与三角形的碳相连的三个基团的大小，如乙醛中的顺序是氧、碳、

氢，然后按下图所示面朝纸面前方的方向（两种），观察大小基团的顺序，顺时针的称为re面（拉丁文rectus，右）；逆时针的为Si面（拉丁文sinister，左）。按同理，反丁烯二酸朝纸面前方的面为re-re面，在纸面背面的面为Si-Si面；而顺丁烯二酸朝纸面前方的面为re-si面，而纸面背面的为si-re面。

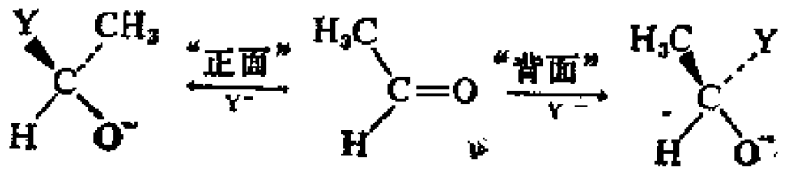


1.4.2 酶和非酶反应的立体化学差异

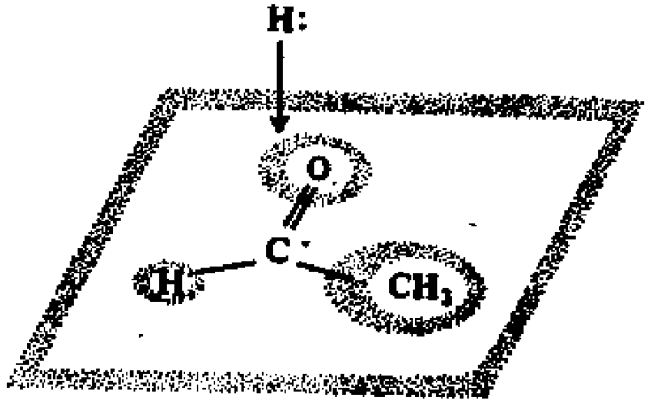
非酶促反应一般是在均相溶液中进行，而酶的反应发生在蛋白质（不对称）的表面。这样，不对称的酶可赋于对称底物的反应以不对称性。例如，在下图中的CH_2RR'，当附着在酶上不对称的活性位置时，可使两个氢原子处于不同的环境中，从而从等性转为不等性。



另一个例子是羰基和碳碳双键的反应，在简单化学反应中，试剂朝两个面进攻的机会是均等。但在酶反应中，进攻只发生在一个面上，因为底物连在不对称的活性位置处，只有一个面暴露给进攻的试剂：

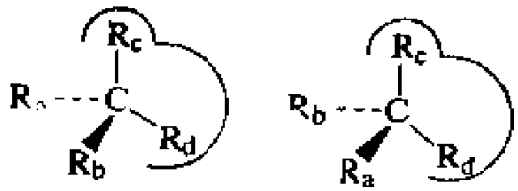


酶对两个潜手性面的选择作用可用下图说明。当酶的表面有大、中、小三个孔穴容纳底物乙醛时，乙醛中的甲基可进入大孔，氧原子进入中孔，氢原子进入小孔。这样，乙醛的si面朝内与酶结合，而re面朝外暴露给还原试剂。如果想使 re 面与酶结合，那



么大体积的甲基是对应于小的孔穴，这对结合是不利的。当然，专一性不同的酶的孔穴的大小关系也可不同。由上可知，在体内反应时，羰基的两个面是不等性的。这两个面也称为对映异构面（enatiotopic faces）。

酶对对映的手性底物是有识别能力的。大约在 50 年前就有人提出：酶对手性分子的识别意味着底物至少要有三个围绕手性碳的基团与酶相互结合，就是所谓的“多点附着理论”。如果只

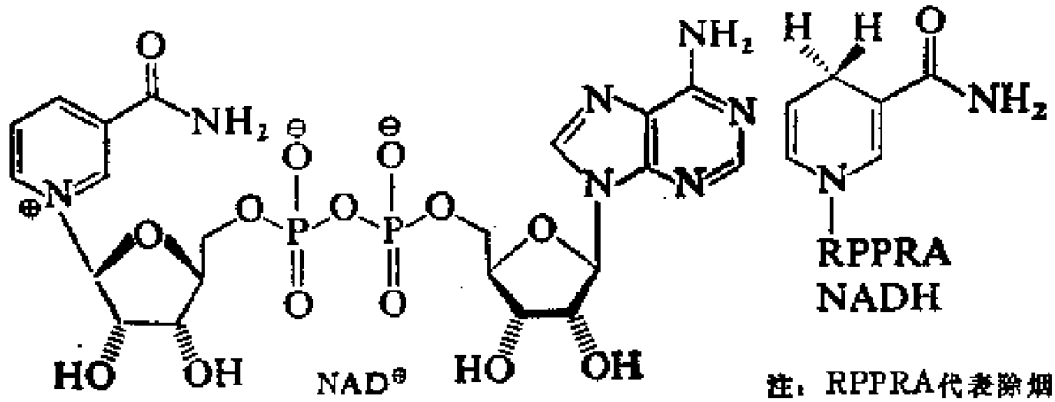


有两个基团与酶结合，那么另两个基团可互换而不影响与酶的结合，这样也就没有了选择性。

1.4.3 酶的立体专一反应的例子

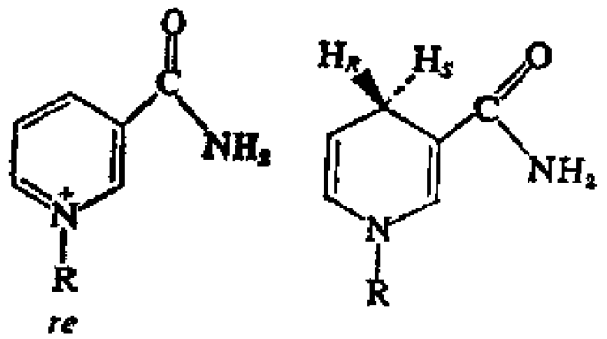
（1） 依赖NAD^+和$NADP^+$的氧化还原酶反应：

NAD^+和$NADP^+$是指烟酰胺腺嘌呤二核苷酸及其磷酸酯，它们的氧化型和还原型的结构如下：



注：RPPRA代表除烟酰胺外的其它部分

二氢烟酰胺环的4-位是手性的。烟酰胺环和二氢烟酰胺环4-位上的氢原子可按 1．4．2节的规定进行标定。由于$-CONH_2$基是优先于其它部分，因此有下列结果：

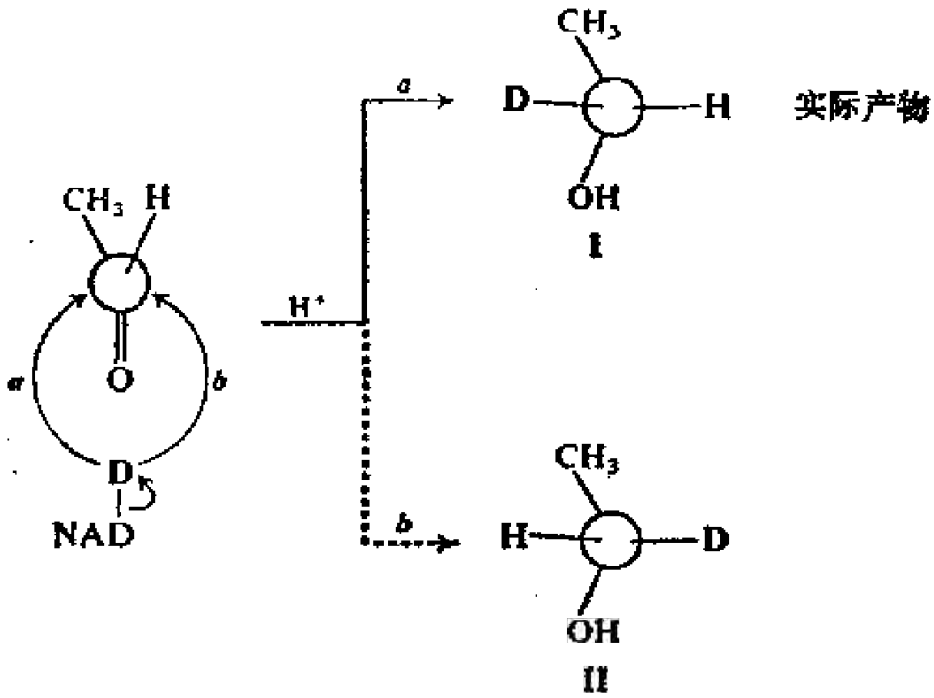


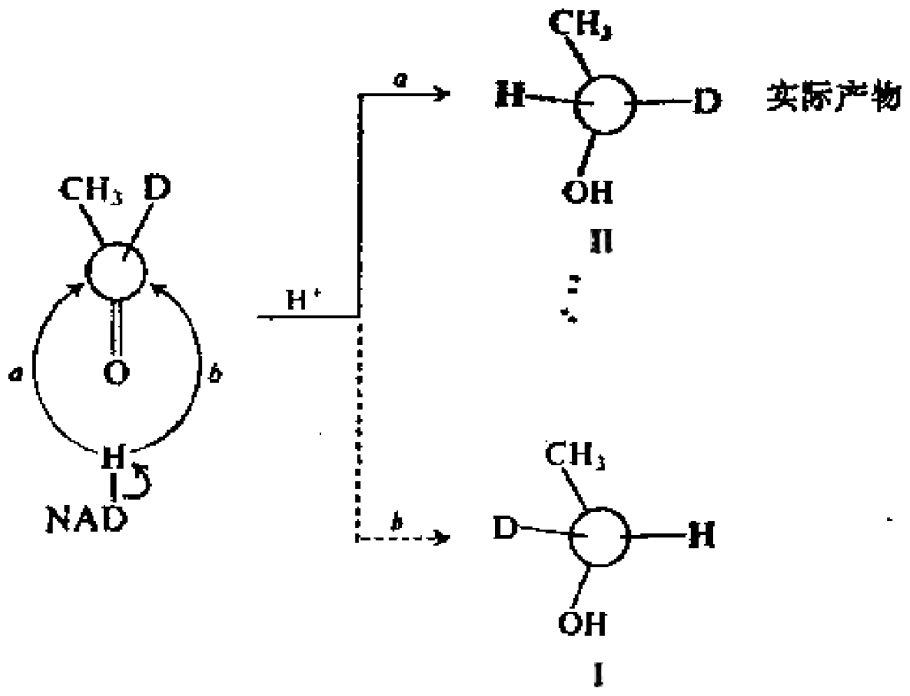
有实验结果表明，酵母醇脱氢酶可从CH_3CD_2OH转移一个D给NAD^+，形成pro-R氘的NADD，这说明氘是从 re 面进攻烟酰胺环。同样，当形成的 NADD 在酶存在下与未标记的乙醛进行反应时，全部氘从NADD失去，即失去 pro-R 氘，生成含有氘的醇（I）：

$$NAD^+ + CH_3CD_2OH \longrightarrow NADD + CH_3CDO + H^+$$

$$NADD+CH_3CHO+H^+ \longrightarrow NAD^+ + CH_3CDHOH(\text{I})$$

当用未标记的 NADH 与标记后的乙醛在酵脱氢酶作用下反应时，也生成手性的醇，但为上述醇(Ⅰ)的对映体——乙醇(Ⅱ)。





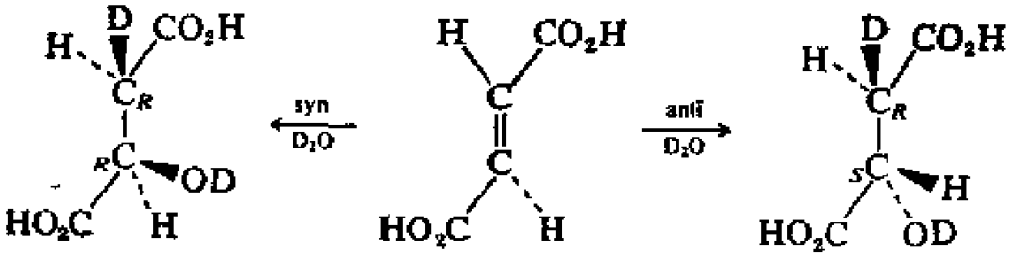
$$NADH+CH_3CDO+H^+\longrightarrow NAD^++CH_3CDHOH(\text{Ⅱ})$$

经其它途径证实乙醇(Ⅰ)具有R-构型;乙醇(Ⅱ)具有S-构型。这种选择性的产生是与醇脱氢酶的专一性有关。当乙醛还原时应有两个方向，但从醇脱氢酶的还原情况来看，反应只发生在re面。

(2) 富马酸酶催化的双键水合的立体化学

富马酸酶催化富马酸水合生成苹果酸。当反应在 D_2O 中进行时，产物的 NMR 谱分析结果表明，D_2O是反式 (anti-)，而不是顺式 (syn-) 加到双键上，即D^+加到顶部的 re面，OD^-加到底部的si面而不是都加到re面。

在三羧酸循环中其它酶的催化水合也都是反式的。根据微观可逆原理,苹果酸进行脱水反应时,两个羧基一定是处于反式的构



Re面

象。在研究酶反应的立体化学时，可以看出，同位素标记的方法是十分有力的工具。

张珮瑛

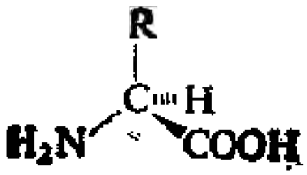
第 2 章　氨基酸和多肽的生物有机化学

蛋白质和核酸是生命的物质基础。构成人体的种种蛋白质都是人体以各种氨基酸为原料合成的。因此，本章将以氨基酸和多肽的一些生物有机内容为论题，力图从有机化学的角度去了解体内的一些生物转化过程（有些内容将在酶化学和辅酶化学两章中进一步介绍）。除此之外，本章还将对与肽类药物设计有关的神经肽化学以及酶的化学突变作一简介。

2.1　氨基酸的结构特征与生物功能

蛋白质是生命现象不可缺少的一种生物高分子化合物。其单体氨基酸都含有一个氨基、一个羧基和一个连在同一个碳原子上的H原子。所不同的是连接在这个中心碳原子上的第四个基团R，除了为氢原子外，都是不同的有机基团。因此，构成蛋白质分子的单体是不相同的。更确切地说，蛋白质是一种十分复杂的共聚物。很多人工合成的高分子是相同的重复结构单元构成的。在自然界中，大约有20种α-氨基酸构成无数种蛋白质大分子。

α-氨基酸的结构通式如下：



R＝H，以及各种不同的有机基团。

脯氨酸和羟脯氨酸分子中的氮原子较为特殊，属于二级胺。因此脯氨酸和羟脯氨酸是α-亚氨基酸。

显然，构成蛋白质的氨基酸彼此之间的差异仅在于侧链R的结构不同。除了R为氢原子的甘氨酸外，其余所有氨基酸均具有光学活性，且皆为L-构型。

从侧链R结构的不同，可将天然氨基酸分成三类：酸性氨基酸、碱性氨基酸和中性氨基酸。

（1） 酸性氨基酸

酸性氨基酸的侧链R具有一个羧基，因而导致氨基酸的酸性特征，在乙醇中可形成不溶性钙盐或钡盐，借此性质可识别酸性氨基酸。天冬氨酸和谷氨酸是酸性氨基酸。

（a） 天冬氨酸（Asp）

$R=-CH_2COOH$；pKa（β—COOH）=3.86

（b） 谷氨酸（Glu）

$R=-CH_2CH_2COOH$；pKa（γ—COOH）=4.25

（2） 碱性氨基酸

碱性氨基酸是侧链R具有一个碱性基团。此类氨基酸的识别可借助其与某些酸（例如苦味酸）形成沉淀的能力。碱性氨基酸的成员包括下列四个。

（a） 赖氨酸（Lys）

$R=-(CH_2)_4-NH_2$；pKa（ε—NH_2）=10.53

可以预料，四个亚甲基可使蛋白质分子具有一个可自由摆动的柔韧性的氨基。此氨基在生理条件下总是以质子化形式（$\overset{+}{N}H_3$）存在。在很多酶催化反应中，常能起到稳定具有负电荷的过渡态（或中间体）的作用（见第三章RNA水解酶作用机理）。

（b） 羟基赖氨酸（Hylys）

$R=-(CH_2)_2-CHOH-CH_2NH_2$；

pKa（ε—NH_2）=9.67

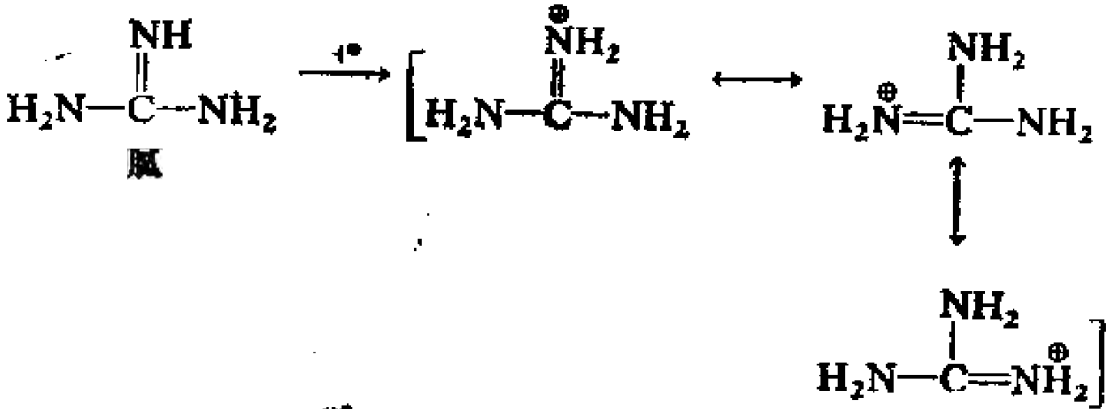
此氨基酸只存在于结缔组织蛋白质中，即胶原蛋白中。

（c） 精氨酸（Arg）

$$R=-(CH_2)_3-NH-\underset{\underset{NH}{\|}}{C}-NH_2;\quad pKa=12.48$$

胍基是精氨酸所特有的强碱性基团。胍是已知的最强的有机碱之一，其碱性与氢氧化钠相仿。因此，在生理 pH（7.35）环境中，胍基也总是被质子化的。精氨酸的这种结构形式，可使胍基在体内与磷酸根产生特异的作用。

胍基的强碱性是由于亚胺（$\rangle C=NH$）比伯胺更容易经质子化形成共振稳定的阳离子。也就是说胍比氨更容易质子化。下列质子化反应式可说明这个道理。

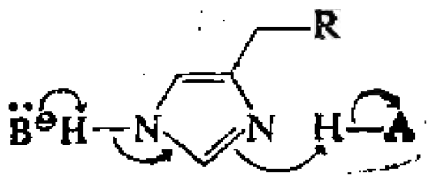


（d） 组氨酸（His）

$$R=-CH_2-\text{咪唑环};\quad pKa=6.00$$

组氨酸分子中含有一个咪唑基，它既是一个弱酸，又是一个

弱碱，还是一种极好的亲核试剂。它是 pKa 值接近生理 pH 值（7.35）的唯一的氨基酸。在生理环境中，它既能接受质子，又能解离质子。特别的是，它还具有在环的一边接受质子，而在环的另一边给出质子的功能，起到一种质子传递体系的作用（详见第四章 4.3）。由于这些特性所致，组氨酸的咪唑基常是构成酶的活性中心上的重要基团。



（3） 中性氨基酸

中性氨基酸含有既不给出质子，又不接受质子的烃基侧链。最简单的氨基酸（唯一不具有旋光性）是甘氨酸。

（a） 甘氨酸（Gly） $R=-H$

此氨基酸虽然不参与酶的催化作用，但可增加结构成份的紧密度，所以许多结构性蛋白质如胶原、丝和羊毛等都含有大量的甘氨酸。

另外，有许多中性氨基酸，由于烃基侧链的存在而具有疏水性。这些氨基酸包括：

（b） 丙氨酸（Ala） $R=-CH_3$

（c） 缬氨酸（Val） $R=-CH(CH_3)_2$

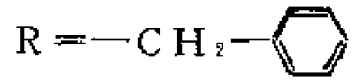
（d） 亮氨酸（Leu） $R=-CH_2CH(CH_3)_2$

（e） 异亮氨酸（Ile） $R=-\underset{\displaystyle CH_3}{\overset{\displaystyle |}{CH}}CH_2CH_3$

这些不同的侧链在疏水性能上存在着极细微的差异。

含有芳香烃侧链的氨基酸有苯丙氨酸和酪氨酸。

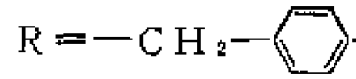
（f） 苯丙氨酸（Phe）



$\lambda_{max}=259nm$

芳香侧链中存在着可极化的π电子云。苯丙氨酸经羟基化，可引入一个羟基，形成酪氨酸。

（g） 酪氨酸（Tyr）



$\lambda_{max}=288nm$

酪氨酸具有一个可解离的酚羟基（pKa=10.07）。在体内，苯丙氨酸能转化成酪氨酸，因此，苯丙氨酸为人体必需氨基酸，而酪氨酸则不是必需氨基酸。这两种氨基酸均为合成肾上腺素的前体。

其它中性羟基氨基酸还有丝氨酸和苏氨酸。

（h） 丝氨酸（Ser） $R=-CH_2OH$

羟甲基（pKa～15）在通常的生理条件下是不可能解离的。然而，丝氨酸在许多生物化学反应中起着重要的作用。如在一类称为“丝氨酸蛋白酶”的活性中心，丝氨酸是重要的催化残基。这是由于伯羟基在适宜的条件下，具有充当亲核试剂的能力（详见第四章 4.3）

（i） 苏氨酸（Thr） $R=-CHOHCH_3$

苏氨酸分子侧链R中的羟基是否参与生物化学反应，目前尚不清楚。

用硫原子替换丝氨酸侧链中羟基的氧原子，则可成为一个可解离质子的氨基酸——半胱氨酸。

（j） 半胱氨酸（Cys）

$R=-CH_2SH$, $pKa=8.33$

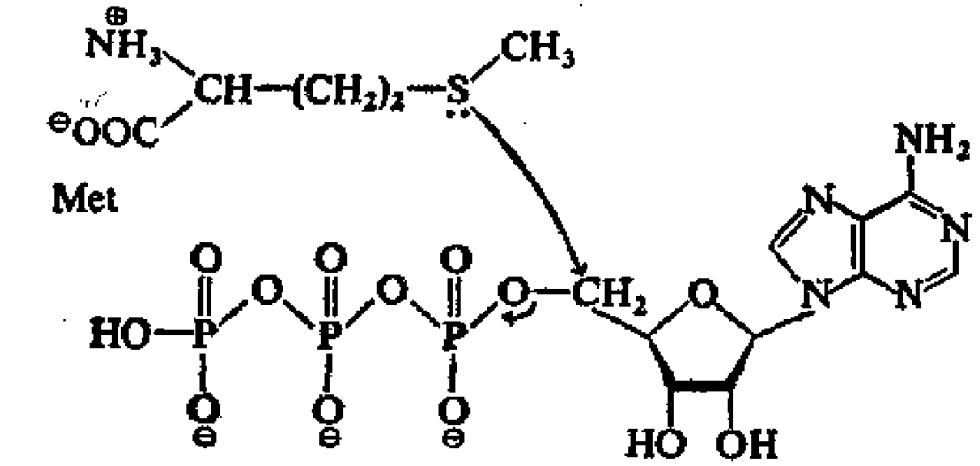
半胱氨酸侧链中巯基的硫原子，本身具有可极化性（或称具有弹性电子云）。因此，半胱氨酸是一种很好的亲核试剂，它象丝氨酸一样，能参与许多生物化学反应。巯基很容易氧化成二硫

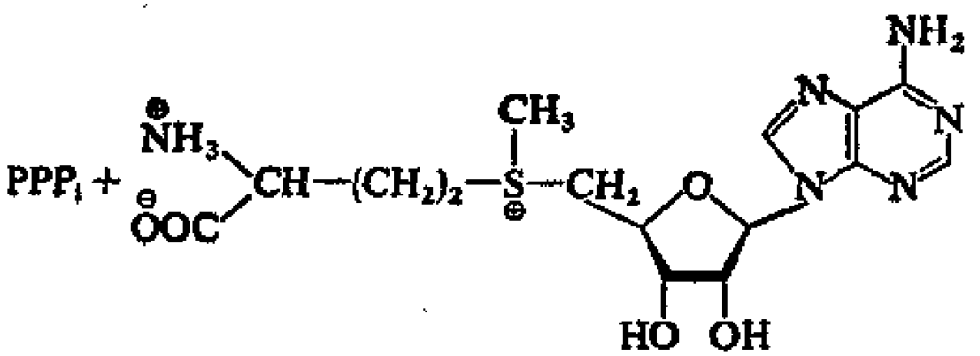
化合物。只要将半胱氨酸的水溶液暴露在空气中，马上就产生胱氨酸。然而，只要在胱氨酸的水溶液中加入适当的还原剂，又可转换成半胱氨酸。二硫键常出现在两个半胱氨酸之间，尤其是分泌到细胞外的蛋白质结构中常有二硫键，以此增加稳定性。二硫键可将两条多肽链合二为一，或者说可作为两条多肽链的桥梁。

从以上可知，酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸和半胱氨酸的R侧链上带有极性—OH基或—SH基，因此使这些氨基酸具有亲水性。

另外一个含硫的氨基酸是蛋氨酸。

（k） 蛋氨酸（Met） $R=-(CH_2)_2-SCH_3$

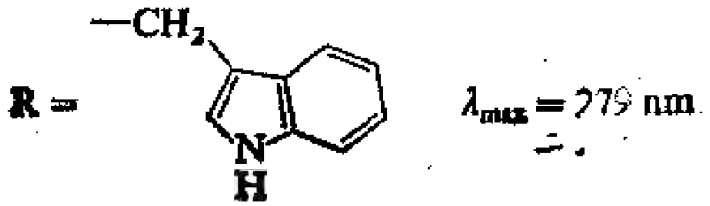




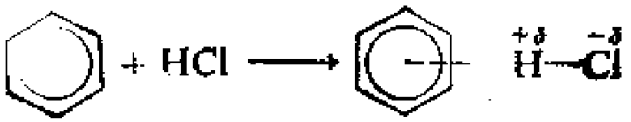
在蛋氨酸的惰性烃基侧链中含有一个高度极化性的中心（即甲硫基中的硫原子），其可对生物能量“贮存库”——三磷酸腺苷（ATP）作亲核进攻，产生一个正电性锍化物—S—腺苷蛋氨酸（SAM）。在生物化学上，SAM是一个重要的甲基供体。

另外，含有吲哚环的氨基酸为色氨酸：

（1） 色氨酸（Trp）



吲哚环是一个极好的π电子供体(电子源)，在有电子受体存在的情况下，可形成电荷转移复合物。在有机化学中有许多电荷转移的实例，例如：氯化氢溶解在苯中，就与苯形成一对一的复合物。



HCl的质子与苯环的π电子具有一种弱的相互作用。

含有苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的蛋白质在紫外区均有吸收，一般最大吸收峰为280nm。

由天冬氨酸和谷氨酸形成的两个伯酰胺的中性氨基酸是天冬酰胺和谷氨酰胺。

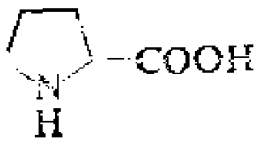
（m） 天冬酰胺（Asn） $R=-CH_2CONH_2$

（n） 谷氨酰胺（Gln） $R=-CH_2CH_2CONH_2$

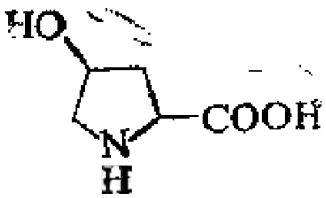
这两种氨基酸侧链R上的羧基转换成相应的酰胺后，酰胺键的氨基能以氢键参与重要的生物化学反应（见第三章 RNA 水解酶作用机理）。

两个亚氨基酸是脯氨酸和羟脯氨酸。

（o） 脯氨酸（Pro）



（P） 羟脯氨酸（Hypro）



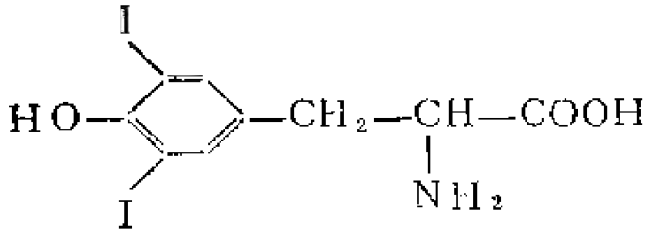
胶原蛋白结构中含有大量脯氨酸和羟脯氨酸。由于这两种氨基酸分子中具有刚性的亚氨基，不利于在肽链内部与邻近的氨基酸之间形成氢键。因此导致胶原蛋白呈无弹性的"三股绳"结构。这就决定了胶原蛋白不可能象肌肉蛋白质那样能收缩，但却比较牢固，抗张能力大。由此可见胶原蛋白作为人体支柱组织的主要成份是与脯氨酸和羟脯氨酸的存在有着十分密切的关系。

除了这些通常构成蛋白质的α-氨基酸外，还有许多其它氨基酸，虽然不存在于蛋白质里，但在生物化学上是重要的。这些氨基酸可以是α-、β-、γ-或δ-取代的氨基酸。例如：神经传递质γ-丁氨酸（GABA）、甲状腺激素前体——2,5-二碘酪氨酸、β-丙氨酸（遍多酸的前体，一种维生素）、β-氰基丙氨酸（一种植物氨基酸）和青霉胺（临床上的一种有用的金属螯合剂）等。存在于蛋白质中的氨基酸均为L-构型。只有少数几个非蛋白质氨基酸是以D构型存在，这些D构型氨基酸一般只在环状小肽链中出现，或者作为细菌细胞壁之肽聚糖的成份。抗菌素——短杆菌素—S（gramicidin-s）就是一实例，其为环状十肽，分子中含有两个D-苯丙氨酸（结构见2.3节）。

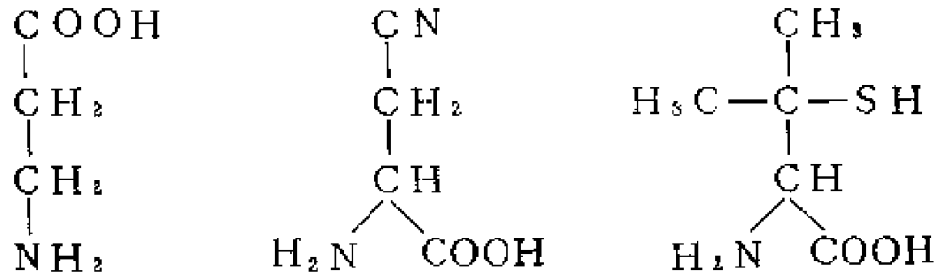
$$H_2N—(CH_2)_3—COOH$$

γ-丁氨酸

(GABA)



2,5-二碘酪氨酸



β-丙氨酸　　β-氰基丙氨酸　　青霉胺

蛋白质的构型及其功能的重要性是很显然的，大家在学习生物有机化学过程中将会进一步加深了解。

20种标准氨基酸的记号列于表2-1。

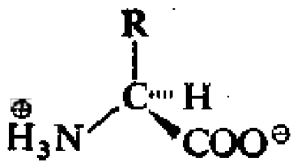
表2-1　20种标准氨基酸记号

名　称	英文名称	三字母符号	一字母符号
丙氨酸	Alanine	Ala	A
缬氨酸	Valine	Val	V
亮氨酸	Leucine	Leu	L
异亮氨酸	Isoleucine	Ile	I
脯氨酸	Proline	Pro	P
苯丙氨酸	Phenylalanine	Phe	F
色氨酸	Tryptophan	Trp	W
蛋氨酸	Methionine	Met	M
甘氨酸	Glycine	Gly	G
丝氨酸	Serine	Ser	S
苏氨酸	Threonine	Thr	T
半胱氨酸	Cysteine	Cys	C
谷氨酰胺	Glutamine	Gln	Q

续表

名　称	英文名称	三字母符号	一字母符号
天冬酰胺	Asparagine	Asn	N
酪氨酸	Tyrosine	Tyr	Y
赖氨酸	Lysine	Lys	K
精氨酸	Arginine	Arg	R
组氨酸	Histidine	His	H
天冬氨酸	Aspartic acid	Asp	D
谷氨酸	Glutamic acid	Glu	E

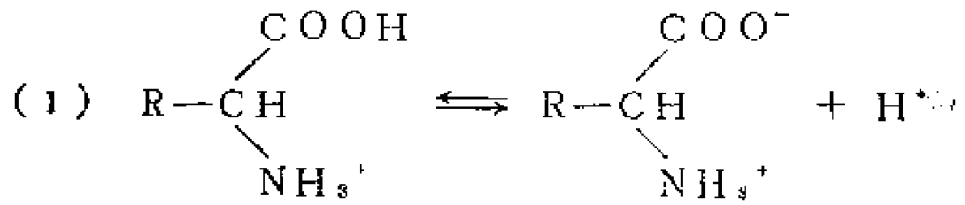
氨基酸含有弱酸性的羧基和弱碱性的氨基，因而它是以偶极离子（dipolar ion，或称内盐）结构形式存在。也就是说，来自羧基上的酸性质子可质子化同一分子内的氨基。

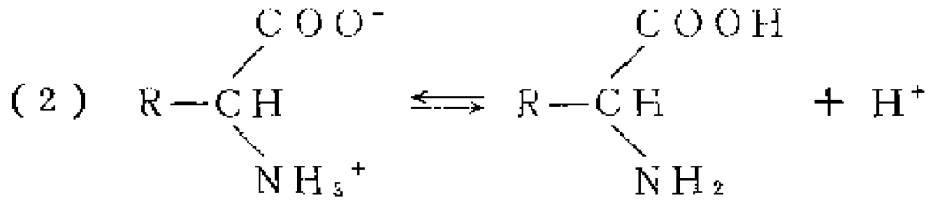


L-氨基酸的偶极离子形式（内盐）

基于氨基酸具有偶极离子结构形式，因此其物理性质与一般有机化合物不同。氨基酸的熔点很高，通常分解点或熔融范围在200—350℃，不溶于有机溶剂，大多数氨基酸只微溶于水，这是由于晶格中分子间存在强静电作用力的结果。

所有的氨基酸在溶液里存在着两种可能的解离形式：





对大多数氨基酸，（1）式 pKa=2.1±0.3；（2）式 pKa=9.8±0.7。

从上述解离式可知，氨基酸的结构形式的变化取决于溶液的pH值。当某一种氨基酸在溶液体系里，主要以偶极离子存在，阳离子和阴离子浓度均达到最低而且相等时，这时溶液的pH值为该种氨基酸的等电点（isoelectric point），缩写为pI。中性氨基酸的等电点为5.6±0.5，酸性氨基酸均低于此值，而碱性氨基酸则高于此值。在等电点时氨基酸的溶解度最低，利用此性质可从蛋白质水解液中分离氨基酸。不同蛋白质是由不同氨基酸构成的，每一种蛋白质具有特征的pI值。因此，利用等电点的性质，同样可达到分离和纯化蛋白质的目的。

2.2 生物体内的肽键化学

由氨基酸和二肽的X衍射研究表明：酰胺键（肽键）是一种SP^2平面杂化结构，具有两个近似相等分布的共振式。两个氨基酸分子之间形成的肽键是以反式二级酰胺形式存在，C—N键不能自由旋转，否则侧面重迭的共振π键将会被破坏。从反式自由旋转成顺式几何形状具有41.8KJ/mol的能量障碍，因此难以发生旋转。从立体因素考虑，具有反式几何结构是更可取的。

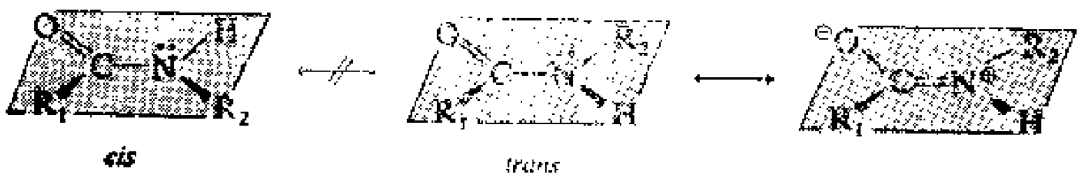


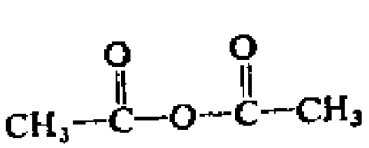
图2-1 肽键的SP^2杂化平面结构

肽键的化学合成主要涉及氨基酸分子中羧基的活化、氨基的保护及此后的偶联。保护基不但是阻断有反应性的氨基酸侧链（如赖氨酸、半胱氨酸、酪氨酸）的反应，而且更重要的是可引导氨基酸有顺序地加入多肽链中。肽键的化学合成，通常有两种方法：第一，将保护了氨基的氨基酸转化成活化形式，然后与第二个氨基酸反应；另一种方法是保护了氨基的氨基酸和另一种保护了羧基的氨基酸在缩合剂（如二环已基碳二亚胺，简称DCC）存在下反应，形成肽键。

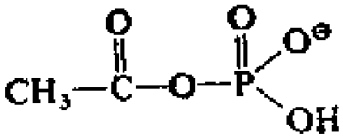
生物体内肽键的合成与通常肽键的化学合成有着极其相似的原理。在温和的生理环境中形成较强的化学键同样需要“活化”氨基酸的羧基，“保护”氨基，同样需要提供能量。

在生物学范围内，酸酐的结构（正像下面所示的结构通式）是一种高能结构，或潜在的能量贮存库。

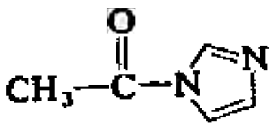
根据上述酸酐结构通式分析，下列结构化合物均可属于酸酐类化合物。



醋　酐



乙酰磷酸酯

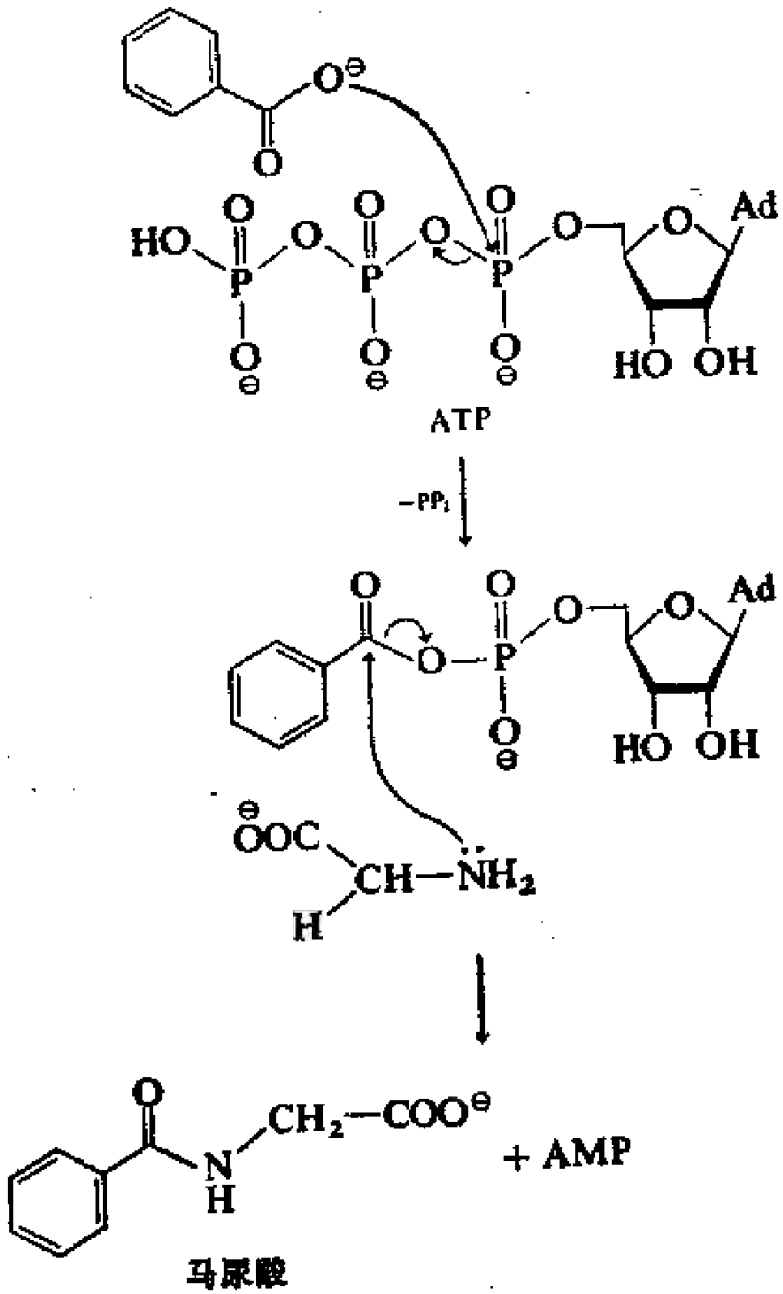


N-乙酰咪唑

生物能量贮存库 ATP（三磷酸腺苷）在其三磷酸酯的侧链里也具有酸酐的结构。在生物化学实验里已证实，ATP 能转化能量活化羧基。在生物体内肽键形成过程中，ATP 起着极其重要的作用。下面以马尿酸的形成为例，先讨论一下 ATP 在活化羧基方面的作用。

马尿酸是苯甲酸在体内的生物转化产物，是哺乳动物尿中的

一种常见化合物，正常人每天排出 0.5—0.7 克马尿酸。人体合成马尿酸是在肝脏内进行，这实际上代表了肝脏的一种解毒作用，使一种有毒物质（苯甲酸）通过与机体内游离存在的物质——甘氨酸结合成无害物质（N-苯甲酰甘氨酸，即马尿酸），然后在尿中排出。合成反应牵涉到苯甲酸的羧基与甘氨酸的氨基

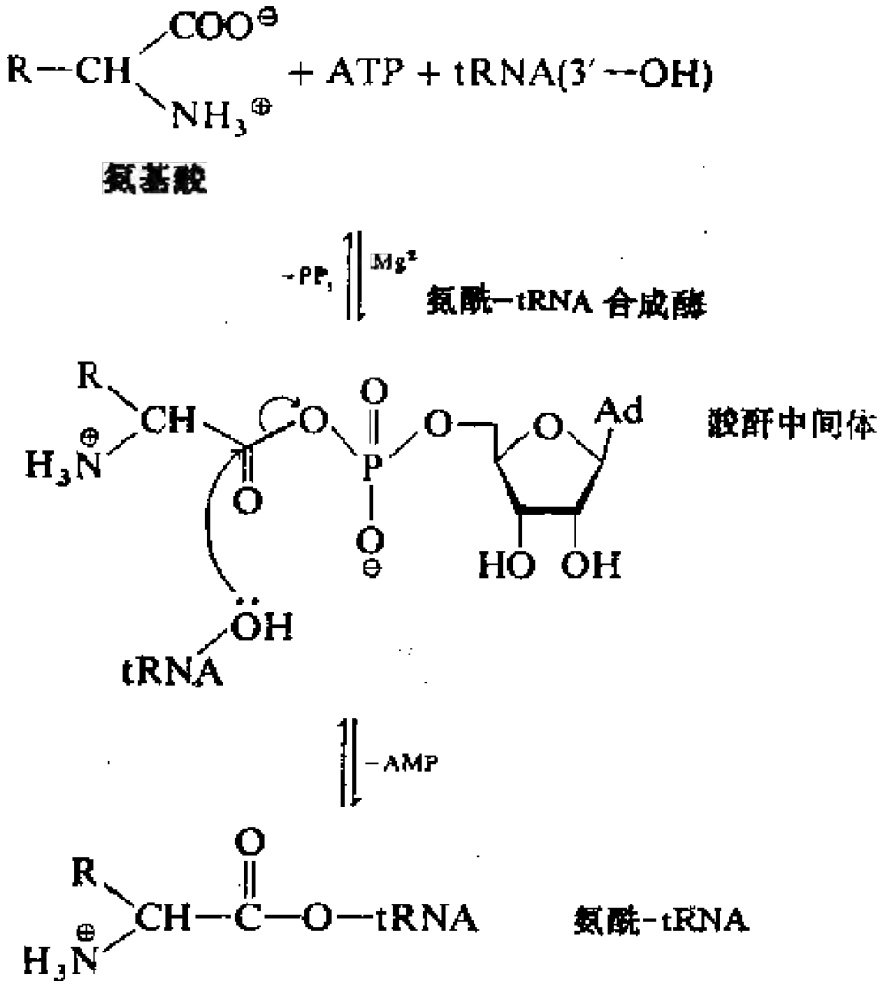


间肽键的形成。其生物合成过程是在酶*的催化和ATP参与下，苯甲酸作为亲核试剂进攻 ATP，生成活化的苯甲酸酯（酸酐中间体）和无机的焦磷酸根（PPi）然后甘氨酸的氨基进攻酸酐中间体，形成N-苯甲酰甘氨酸（马尿酸）。

羧酸活化的原理，同样能够应用于蛋白质分子的合成。在蛋白质合成过程中，主要步骤之一，也就是起始步骤，涉及氨基酸的活化及将活化的氨基酸转移至 tRNA 分子上。在蛋白质分子中，氨基酸之间是以氨基和羧基互相结合形成肽键，但氨基和羧基的反应性不强，不能直接形成肽键，氨基酸的羧基必须经过活化才能进行缩合。氨基酸在氨酰-tRNA合成酶催化和ATP参与下，可形成氨酰腺苷酸（aminoacyl adenylate），一种活泼的酸酐中间体，同时生成一分子焦磷酸根。其化学反应过程是在氨酰-tRNA 合成酶作用下，氨基酸的羧酸根阴离子作为亲核试剂向 ATP 分子进攻，导致形成氨酰腺苷酸。即氨基酸的羧基与一磷酸腺苷的磷酸基以酸酐键键合，从而获得一个高能键，成为活化的氨基酸。但进一步的转化并不是简单地涉及活化氨基酸分子之间的结合。因为蛋白质的合成涉及到许许多多氨基酸要以准确的序列连接，要能有效地确保蛋白质分子中各氨基酸精确无误的顺序，只有tRNA这种大分子才能承担这种功能。

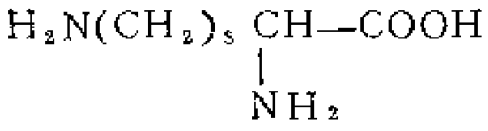
tRNA是活化氨基酸的接受者。细菌细胞约含有 60 种不同的 tRNA，真核生物则有100到120种 tRNA。有许多tRNA已经测定结构，有些得到结晶。已知的tRNA长度为73到88个核苷酸。tRNA分子量在 25 000 到 30 000 之间。所有 tRNA 的3′端都有胞苷酸—胞苷酸—腺苷酸（cytidylate-cytidylate-adenylate，缩写-CCA）三种核苷酸。因此tRNA分子末端腺苷酸的核糖3′-或2′-羟基可进攻氨酰腺苷酸的酸酐键，并以酯键形成氨酰-tRNA（aminoacyl-tRNA）分子。此过程同样由氨酰-tRNA合成酶所催化。

* 酰基辅酶A（HSCoA）和酰基转换酶

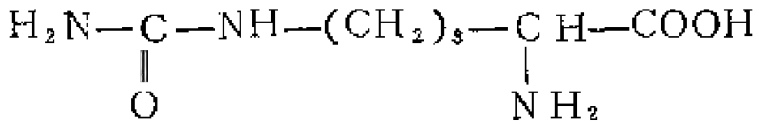


显然，氨酰 -tRNA 中的酯键是一高能键（由于邻接核糖上 2′-羟基及氨基阳离子的作用）因而使此后的整个酶催化合成反应过程自由能的变化接近零。

氨酰 -tRNA 合成酶既能识别特定的氨基酸，又能辨认携带该种氨基酸的特定 tRNA 分子。而每一种氨基酰 -tRNA 合成酶，只接受本身特定的氨基酸作为底物。不过，若对天然存在的氨基酸略加改造或修饰，仍可使其作为酶的底物。例如：对氟苯丙氨酸在一定程度上能代替苯丙氨酸。但氨基酸的 D-构型异构体、鸟氨酸、瓜氨酸和 β-丙氨酸等均不能作为氨酰-tRNA 合成酶的底物。



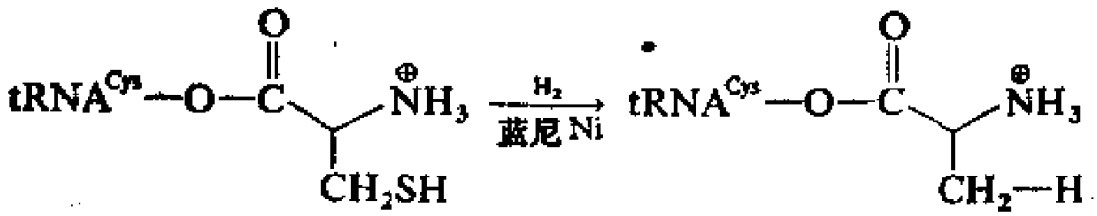
鸟氨酸



瓜氨酸

氨酰-tRNA一旦合成，分子中的氨基酸就不再起识别功能。这个氨基酸键结到肽链的哪一个位置上，是由氨酰 -tRNA分子中的tRNA部分与mRNA所决定的。下面的实例可说明之。

半胱氨酸与其特定的 tRNA 的结合物—半胱氨酰-$tRNA^{Cy}$（cysteinyl-$tRNA^{Cys}$），通过催化还原反应修饰其半胱氨酸侧链，形成丙氨酸侧链。



半胱氨酰-$tRNA^{Cys}$　　丙氨酰-$tRNA^{Cys}$

经修饰过的氨酰 -tRNA（即丙氨酰-$tRNA^{Cys}$），在体外蛋白质合成体系中，丙氨酸就参入到蛋白质分子中原来应该是半胱氨酸所在的位置。

核蛋白体(ribosome) 是普遍见于所有细胞质内的核糖核酸与蛋白质组成的颗粒，是一种大的核糖核蛋白。所有核蛋白体都由两个大小不同的亚单位组成的。核蛋白体是细胞内进行蛋白质生物合成的部位。生物体内肽键的形成发生在核蛋白体上的两个结合部位：一个称为P位（peptidyl site），另一个称为A

位（aminoacyl site）。核蛋白体的P位有转肽酶的存在，可催化肽键的形成。而其余部份蛋白质以及核糖体的RNA(rRNA)，在蛋白质合成期间，参与特定构象相互作用。虽然蛋白质合成是一种动态过程，但此过程要求氨基酸间的结合是以井然有序的方式发生。

蛋白质合成是从N-端氨基酸开始。在一些细菌、酵母和高等动物有机体中，已知第一个氨酰-tRNA是N-甲酰蛋氨酰-$tRNA^{fMet}$（N-formylmethionyl-$tRNA^{fMet}$），氨基的甲酰化，认为是起保护基作用。避免在肽键形成过程中氨基的干扰。蛋白质合成后，可通过酶促分解（甲酰基酶），再将甲酰基移去。甲酰蛋氨酰-$tRNA^{fMet}$首先结合在核糖体上的P位，P位也正是合成肽键的部位。

第二个氨基酸（氨酰-tRNA）也结合在与甲酰蛋氨酰-tRNA（fMet-$tRNA^{fMet}$）相邻的部位，此位置即所谓的A位。当化学反应还未发生之前，这种结合过程需要能量。能量来源于GTP分子（三磷酸鸟苷）A-位的氨酰-tRNA的氨基进攻P-位的甲酰蛋氨酰-tRNA的酯键。在肽键形成的同时，$tRNA^{fMet}$作为离去基离去。此反应为酶促反应，对于肽键的形成，既不需要ATP，也不需要GTP，因为此过程所需的能量可来自高能量甲酰蛋氨酰-$tRNA^{fMet}$酯键的断裂。当此肽键完全形成后，显然必定要发生一些物理变化，以利于另一个氨酰-tRNA进攻二肽。这样，在A位的二肽基迁移至P位，同时移去了$tRNA^{fMet}$。这些过程，很可能由于在核蛋白体上构象的变化，而再需要消耗一分子GTP的能量。现在A位是空余的，且mRNA也已移位，所以一个新的氨酰-tRNA能被指令进入A位。这一过程一旦发生，新的肽键形成就能实现（给出三肽）。图2.2所描述的过程是形成二肽。此后肽键增长的模式也是相同的。

上述只是体内合成蛋白质的一种简单阐述。省略了细节内容。例如，蛋白质合成包含的延长和终止因子等。显然这些过程

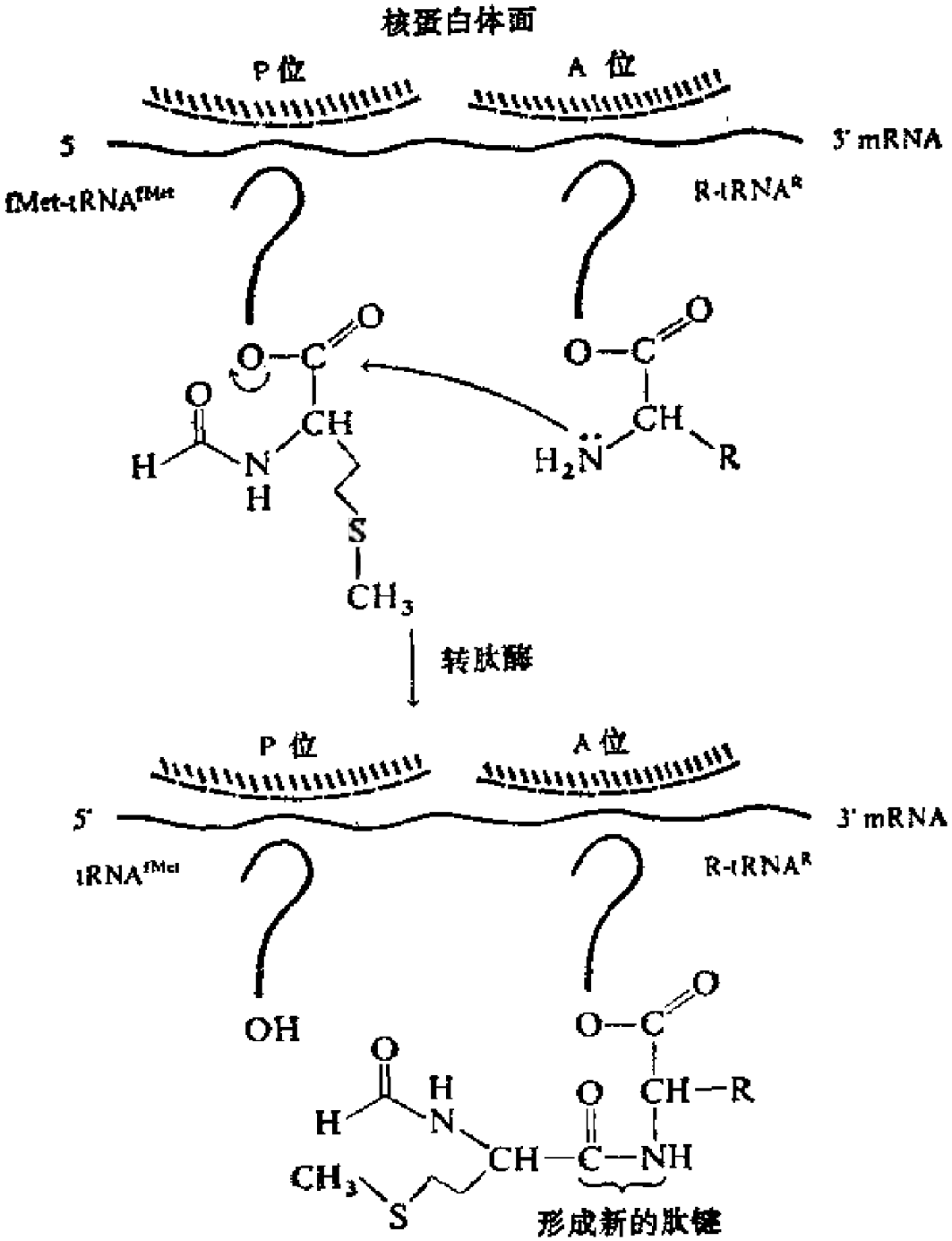


图2-2　生物体内肽键的形成

是十分复杂的。但了解形成肽键一步的基本内容是重要的，即首先是氨基酸的活化，然后，活化的氨基酸在tRNA携带下，转运至定序的核蛋白体上，按顺序缩合成肽。致使错误序列和其它副反应实际上是不可能发生。

学习蛋白质生物合成知识，有着十分重要的意义。首先可运用生物体内蛋白质合成知识研究一些药物的生理作用，或者了解抑制蛋白质合成的一些抗生素的作用机理。有些抗生素既能抑制细菌的蛋白质合成，同时也能干预人体细胞的蛋白质合成，因此显现了潜在的毒性。抗生素嘌呤霉素就是一个实例：嘌呤霉素的结构与 tRNA 末端的腺苷酸非常相似(见图2-3)，所不同的只是嘌呤霉素的5′-羟基未被酯化到 tRNA大分子上，6-氨基与两个甲基相连，3′-羟基被对-甲氧基苯丙氨酸的羧基以酰胺键取代。除此之外，两者极其相似。因此在蛋白质链合成期间，嘌呤霉素分子能够进入氨酰-tRNA部位（例如，核蛋白体上附着酪氨酰-$tRNA^{Tyr}$的

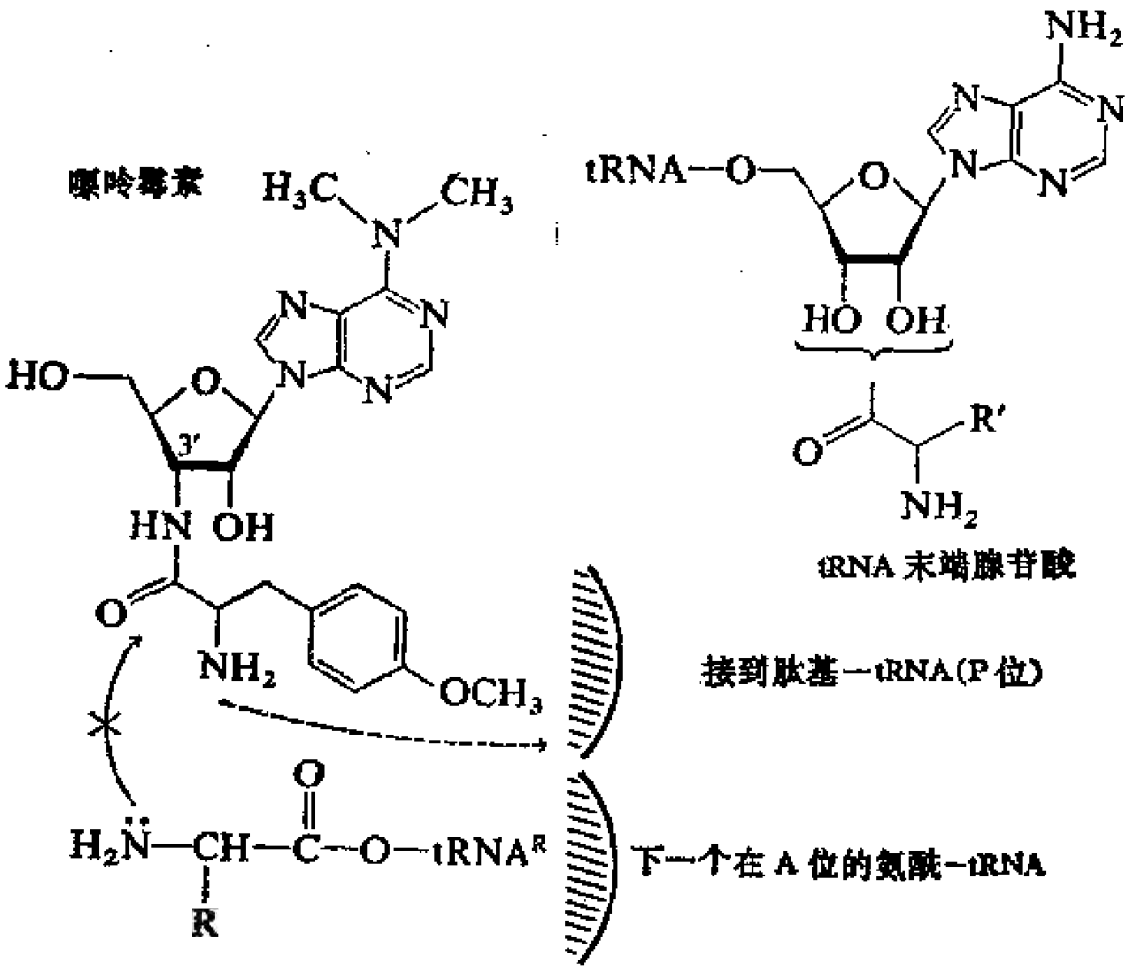


图2-3　嘌呤霉素和tRNA末端腺苷酸的结构

位置)附着于核蛋白体上，进而，嘌呤霉素分子中氨基立即进攻P位的肽基-tRNA，进入蛋白质链中。然而由于嘌呤霉素分子本身3′-位置的肽键是一个较强的酰胺键，不能被下一个氨酰-tRNA（在A位）进攻，因而使蛋白质合成中断。嘌呤霉素不仅能以这种作用机理抑制细菌的蛋白质合成，也能对哺乳动物细胞中蛋白质合成起类似的抑制作用，因此表现毒性大，疗效不佳，多作为工具药在试验中应用，临床上不用。

红霉素和麦迪霉素等大环内酯抗生素皆属于蛋白质合成抑制剂，能选择性地与细菌核蛋白体50 s 亚基（哺乳动物核蛋白体是80 s。由40 s +60 s 亚基构成）部位结合，抑制肽链的移位反应（指抑制肽基-tRNA 由A位移向P位）。从而中断细菌蛋白质的合成。这就是这类药物在临床上广泛应用的基础。

2.3 非核蛋白体的肽键生物合成

有些微生物，还可在不用核蛋白体的情况下完成肽键的合成。合成的次序则由酶控制。这种简单的、原始的肽键合成方法，只能合成小的多肽。下面以抗菌素短杆菌素—S（gramicidin S）为例讨论之[1]。

短杆菌素是由短杆菌（*Bacillus brevis*）分离得到的一种具有特异结构的环状十肽：它含有D构型苯丙氨酸。存在于蛋白质中的氨基酸只有L构型氨基酸。天然存在的D构型氨基酸是十分罕见的。其次，短杆菌素还含有一种蛋白质非正常成份的氨基酸—鸟氨酸。此环状十肽是由两个相同的五肽组成的，分子具有一个二重对称轴（见图2-4）。

短杆菌素的抗菌活性是由于它本身具有络合碱金属离子的能力，并能输送它们穿过细胞膜，起着离子渗透通道的作用。人们可把它想象为炸面饼圈的形状，它能在圈内包容金属离子并携带金属离子透过细胞膜。其结果是膜内离子的渗透压增高，最后导

致膜的破裂，从而达到杀菌的目的。遗憾的是这种作用并不限于对细菌的膜，因此短杆菌素只能局部使用。

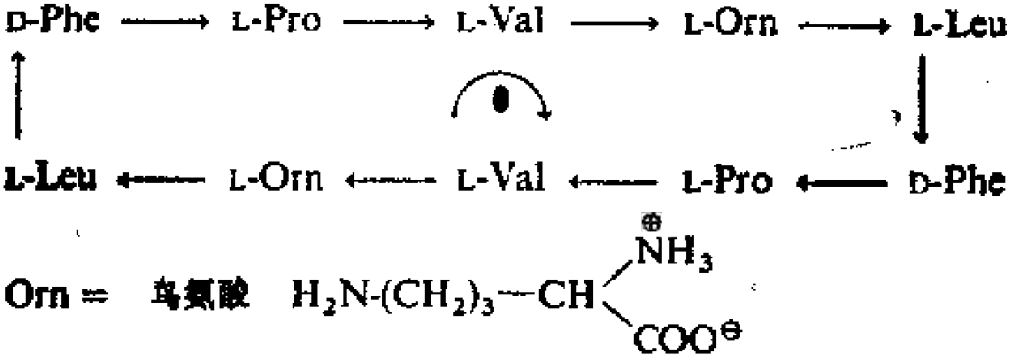


图2-4 抗菌素短杆菌素-S的结构
Orn=鸟氨酸

下面说明在没有核蛋白体的情况下，天然存在的不对称大分子蛋白质复合物（酶）对于环状多肽合成的可行性。这种过程是由生物化学家 Lipmann 译解的。它只存在于像细菌这样简单的有机体中。

Lipmann 发现只要将ATP加到原细胞匀浆和从短杆菌制备得到的萃取物中，即可促进短杆菌素-S的合成。在无微粒的上清液部分有活性，它不受已知的蛋白质合成的抑制剂以及核糖核酸酶处理的影响，这就排除了核蛋白体和RNA分子的参与。在此生物转化中，ATP 履行了缩合剂的功能，它有点类似于肽键化学合成缩合剂-二环已基碳二亚胺。

在短杆菌素-S的合成中，涉及两种酶：分子量较小的轻酶（MW＝100 000）和分子量较大的重酶（MW＝280 000）。合成开始于轻酶，它同样具有“消旋酶”（“racemase”）的功能，将L-苯丙氨酸转化成D-对映体。在轻酶上的巯基可作为亲核试剂，进攻活化的苯丙氨酸（ATP 和苯丙氨酸反应形成的酸酐中间体）生成高能量的苯丙氨酸硫醇酯复合物。硫醇酯的 $\Delta G_{水解}$ 约－38KJ/mol（－8KCal/mol）。烷硫基（RS-）与相应的烷氧基（RO-）相比。前者为更好的离去基（硫醇的pKa约为10，而醇的pKa则为15）。

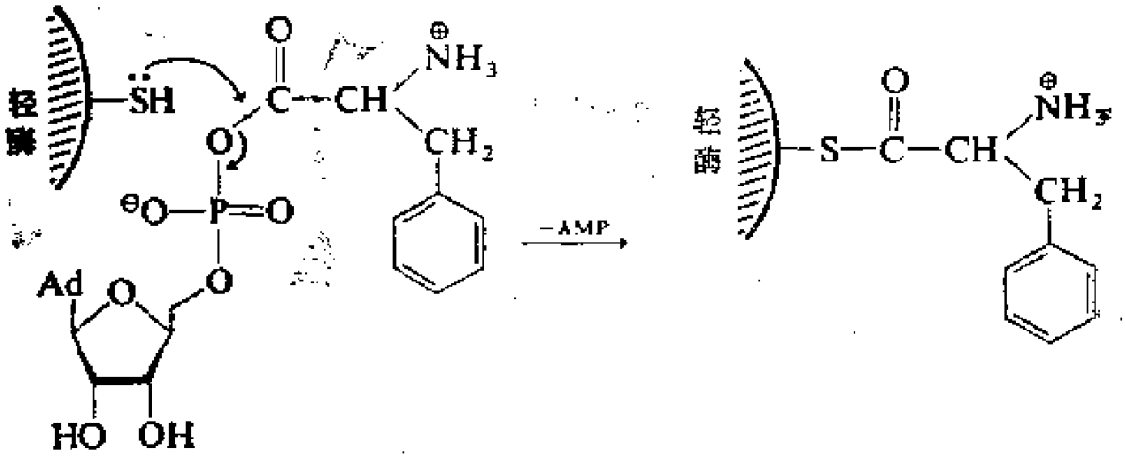


图2-5　苯丙氨酸硫醇酯复合物的形成

在下一步，以硫醇酯键连接在重酶上的辅氨酸进攻轻酶上硫酯键的羰基，形成二肽酰基S-重酶复合物。将二肽由轻酶转移到重酶上。这样轻酶的功能就此被终止。

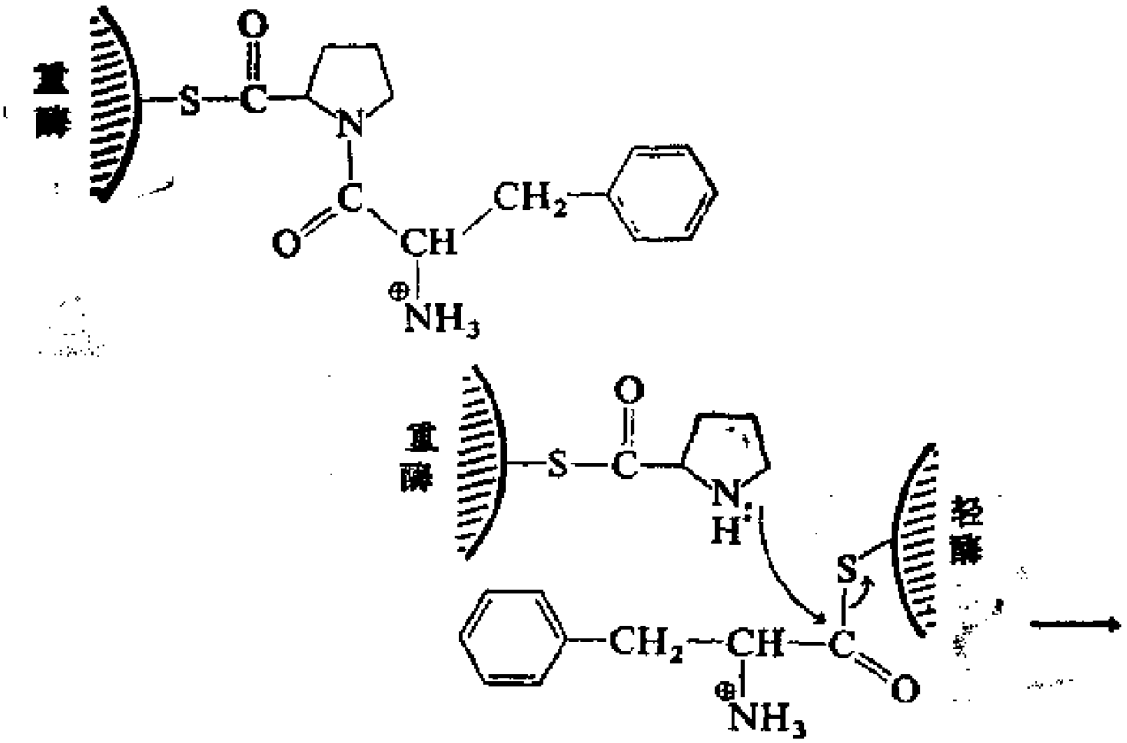


图2-6　二肽酰基S-重酶复合物的形成

类似地，在重酶上以硫醇酯键连接的缬氨酸的氨基又进攻二肽硫酯键的羰基，形成三肽产物（三肽酰基-S-重酶复合物）。

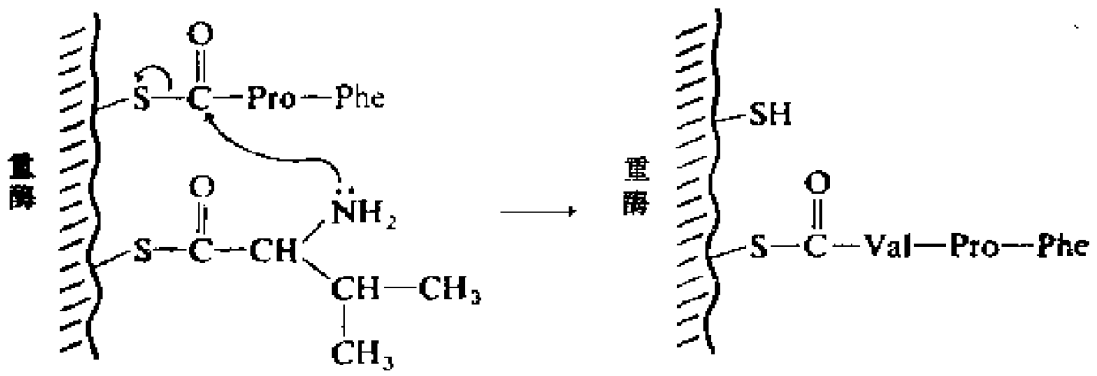


图2-7　三肽酰基-S-重酶复合物的形成

形成肽键的能量来源于硫醇酯的氨解。

以下是涉及重酶上的“摆动臂”的作用（见图 2-7）。这个臂经本身硫醇的巯基（-SH），可进攻和连接三肽。然后通过鸟氨酸的进攻，形成四肽，并由臂的相同的巯基连上四肽。以类似的方式通过亮氨酸进攻四肽，形成五肽，并连在臂上。但在此后，此五肽是被另一条相同的五肽（连在另一条臂上的）进攻，并最终形成分子呈二重对称轴的环状十肽。即短杆菌肽-S。

简言之，由于两种酶之间四部份相互作用的结果，使两个氨基酸彼此足够接近，以致形成肽键。这种过程重复五次便可形成两个等同的分子（相当于环状十肽的一半），最后，这两个相同的链从蛋白复合物上断解下来，同时形成环状十肽。如图2-8所示。

在重酶中存在的“游动臂”是由β-巯基乙胺和泛酸（辅酶A的重要成份）组成的。泛酶与重酶的丝氨酸以磷酸二酯键相连。游动臂的结构如下图所示

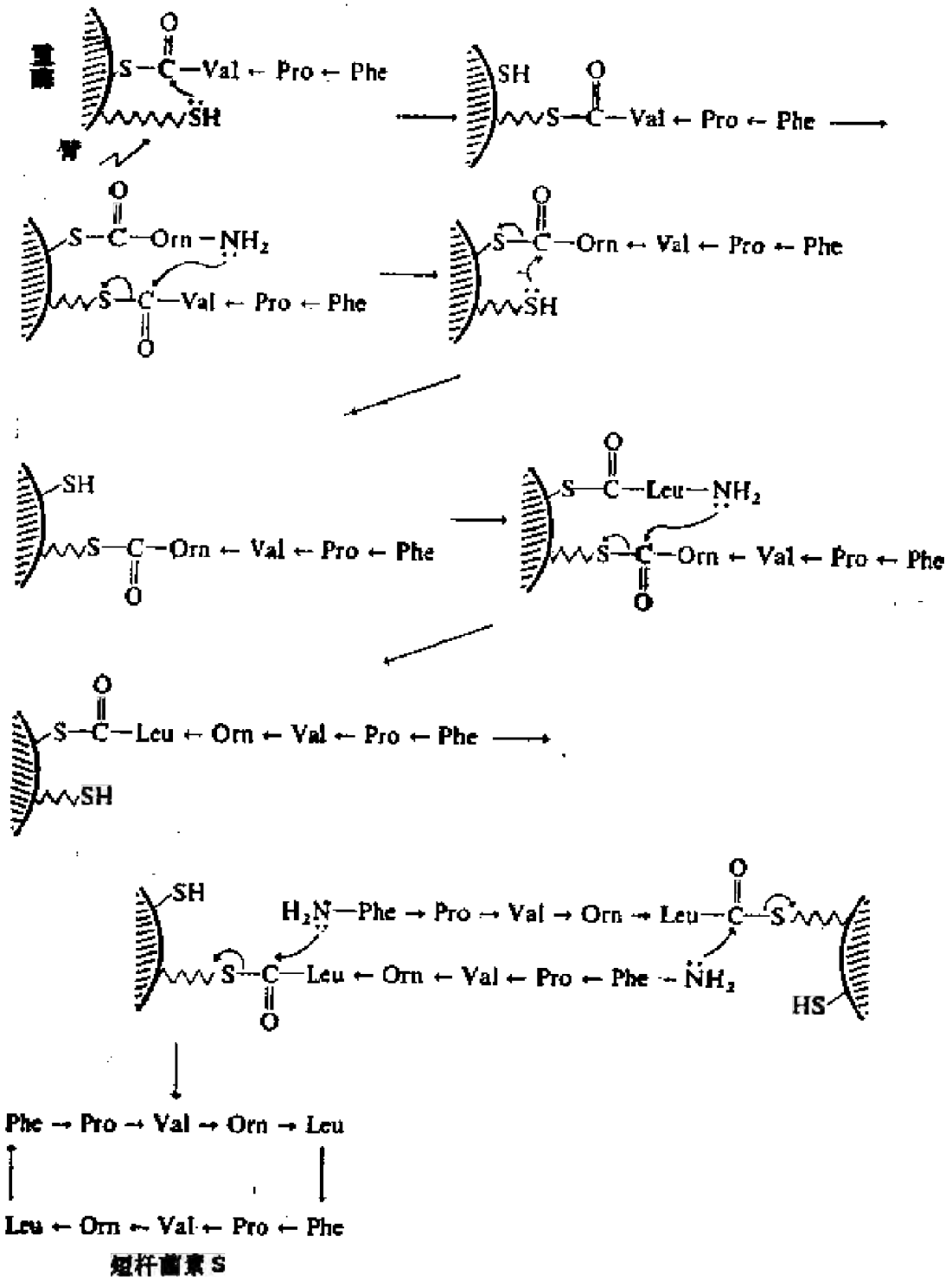


图2-8　短杆菌素S的合成（从三肽开始）

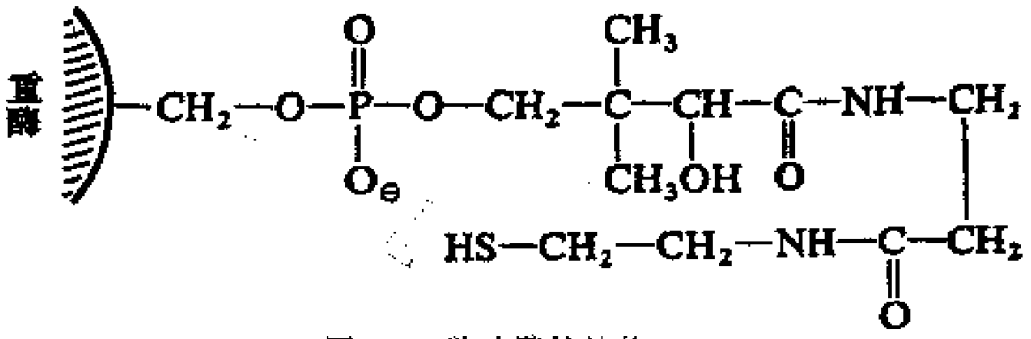


图2-9　游动臂的结构

图 2-10 给出一种不同的表示方法，说明只有轻酶对 D-苯丙氨酸在序列中的存在负有责任。抗菌素的其余部分是通过重酶合成的。

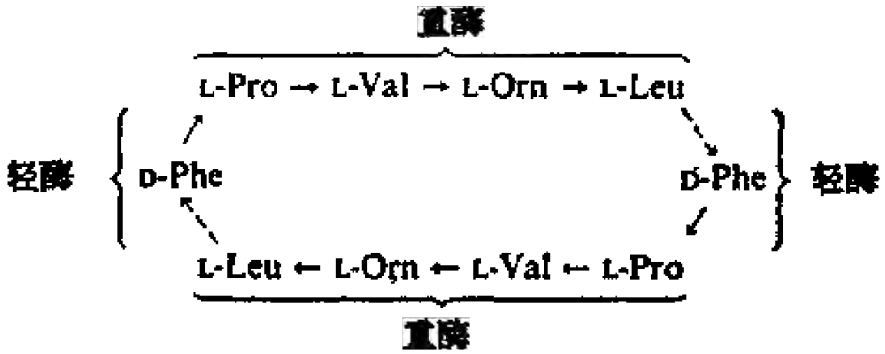


图2-10　短杆菌素 S 中的氨基酸序列
（括号表示重酶和轻酶各自所活化的氨基酸）

重酶和轻酶这两种酶，对正确识别氨基酸和携带它们进行指定的不对称合成以及环肽分子的合成具有足够的三维定向作用，也就是存在了这种特殊的蛋白质之间的相互作用，才能发生有效的多肽合成。换言之，对于短杆菌素-S 的合成需要的所有分子信息，都来源于这些可进行氨基酸的识别和合适肽键合成的大分子复合物。这种无核蛋白体的多肽合成也是说明手征性重要作用的突出例子。虽然目前我们还不能在实验室进行这样一种高效的肽合成，甚至连Merrifield的固相合成法也不能达到完美的程度。然而已能合成类似物。它们之间的类似性是显然的。例如，Letsinger 等人发展的一种模板定向图式多肽合成方法[2]就是

以在核蛋白体上进行合成的天然机制为基础的。此法利用树脂作为支撑物和一个多核苷酸作为模板，而且不需要对氨基酸进行暂时的保护，该法称为肽合成的互补载体法(complementary carrier method)。它与天然核蛋白体的作用机制具有许多相似之处。其内容概述于图2-11。

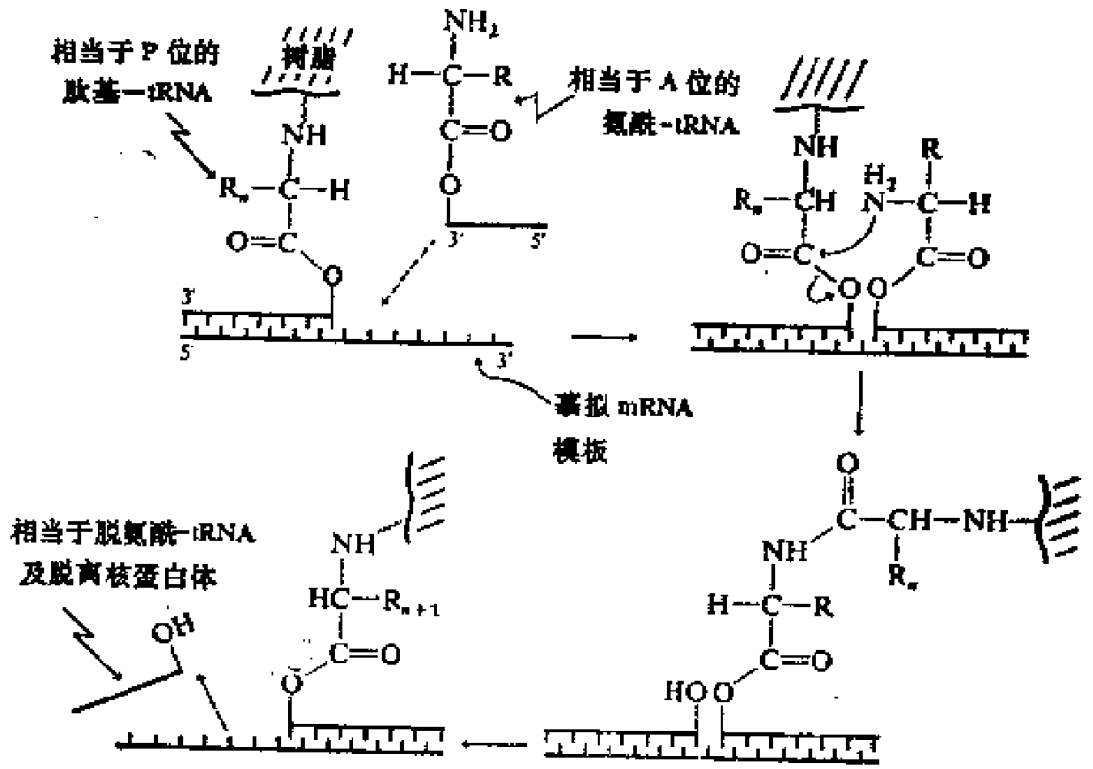


图2-11 Letsinger和Klotz的肽合成的互补载体图式

实际上，合成过程中增长的多肽链是以其末端羧基与载体寡聚核苷酸（与模板互补的）5′-位上的羟基通过酯键相键合。进入的新的氨基酸也是以酯键相连接，不过是与第二个寡聚核苷酸载体的3′-位羟基形成酯键。通过螺旋体稳定性方面的多种研究得出，八个核苷酸长度的载体足够通过Watson-Crick碱基配对完全键接到较长的寡聚核苷酸模板上。近代肽键形成的化学方

法是习惯于通过逐个氨基酸增长多肽链。为了进行下一步合成，需在破坏碱基配对的条件下(升高温度或降低离子浓度)，从连有肽段和载体寡核苷酸的不溶性固体支撑物上，洗去未键结的寡核核苷酸（包括模板和载体）。然后再重复以上循环反应一直持续到所希望的多肽分子全部合成。要注意到，在每一步中，增长的多肽链被转移到互补的载体寡聚核苷酸上，然后，在合成的最后一步，最终将载体从固体支撑物上断裂下来。合成过程中一直保留着连接的寡聚核苷酸，有利于多肽分子纯化时的色层操作。最后可在温和的碱性条件下将其从肽段中除去。这种方法的重要特征是通过特定模板定向的酰基转移反应，可达到酰胺键（肽键）形成的精确性。因此肽基和氨基酸寡核苷酸在多核苷酸模板上的合适并置，控制着多肽的合成方向。实质上，这是重现了天然体系蛋白质生物合成途径的方法。此方法说明在没有蛋白质或核蛋白体的情况下，寡聚核苷酸怎样控制多肽的合成。因而是一种对前生命蛋白质的来源颇有吸引力的生物有机模型。

2.4 神经肽化学

我们在自然界中可以看到各种各样的蛋白质和活性多肽，它们具有自己特有的生物功能。例如，在微生物来源的活性多肽中就包括抗菌素多肽和细菌细胞壁多肽等。肽类作为丘脑下部-垂体前叶释放因子或调节激素所起的重要作用的阐明，促使人们近些年来认识到肽也可能是神经系统其他部位的细胞间信使。为此本节以神经肽 (neuropeptide) 为例，简要介绍一些有关神经肽化学的内容，力图从中了解其化学本质。

镇痛药能在各种感觉中选择性地抑制痛觉，这是由于对疼痛刺激作出反应的神经上存在着高密度的阿片受体所致。镇痛药与阿片受体结合后产生的生理功能，能提高痛觉的刺激阈，使疼痛减轻或消失。使镇痛药产生生物效应的阿片受体至少有 μ、δ-和

K三型受体。

各种镇痛药对不同受体的亲和力和产生的活性都不相同。吗啡生物碱类优先结合μ-受体；内源神经肽如脑啡肽（enkephalins）主要显示δ活性；β-内啡肽（β-endorphin）大多显示μ活性；而强啡肽(dynorphin)则具有k-受体活性，它是由17个氨基酸组成的，其中N-端前五个氨基酸，包括亮氨酸脑啡肽（Leu-enkephalin）序列。

其他小肽物质由脑垂体（丘脑下部）直接或间接产生，它们通常可反映机体内异物的存在和来自损伤组织的疼痛感觉。

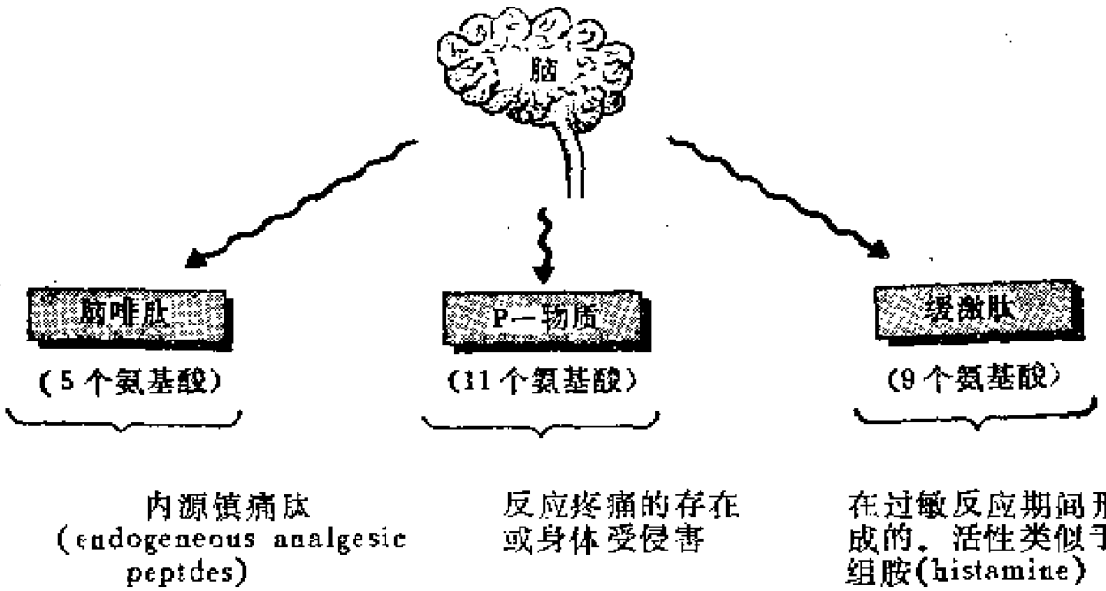
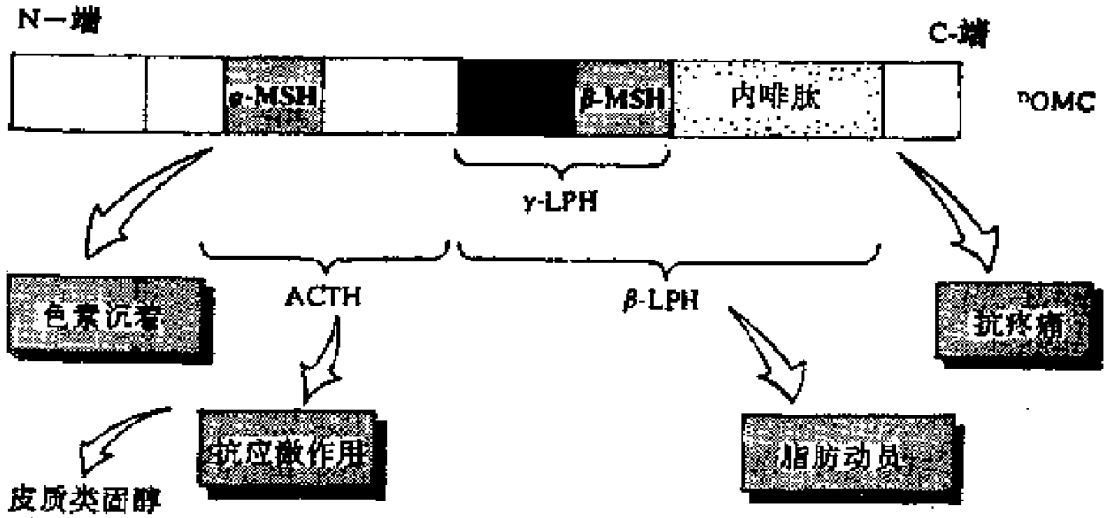


图2-12　脑垂体产生的小肽物质及其作用示意图

前阿黑皮素（proopiomelanocortin）简称POMC，它是内啡肽和脑啡肽等几种肽类激素的前体，由265个氨基酸残基组成，经特异的酶促断解后，可生成多种多肽中间体。其中有些可调节细胞组织的色素沉着；还有一些起着对抗应激反应作用；而内啡肽和脑啡肽则具有镇痛的性质。内啡肽是脂肪酸释放激素（liptropine）的60->91片段。而60->65片段是蛋氨酸脑啡肽（Met-enkephalin）。POMC的构成成份示意图如下：



七十年代初证实了脑内阿片受体的存在，各种镇痛药与阿片受体的亲和力及镇痛效力之间呈现高度相关性。1975年 Hughes[8]发现脑内存在相应的内源性阿片样活性物质——两个五肽：蛋脑啡肽和亮脑啡肽。这两种五肽的差异仅仅在于第五位氨基酸的不同。蛋脑啡肽的第五位氨基酸为蛋氨酸，而亮脑啡肽则为亮氨酸。两者结构分别如下[4]：

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH

蛋脑啡肽

(Met^5-enkephalin)

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH

亮脑啡肽

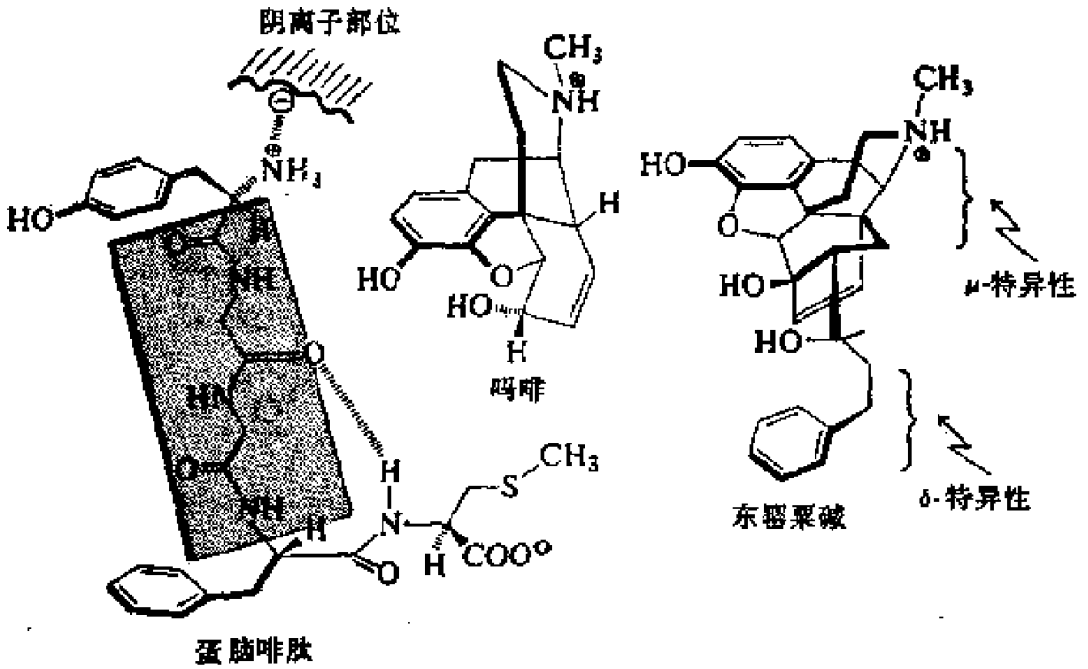
(Leu^5-enkephalin)

蛋脑啡肽和亮脑啡肽在脑内的分布与阿片受体的分布很相符合，并能与阿片受体呈立体特异性的结合而产生吗啡样作用。继发现脑啡肽之后，又发现几种较大的肽类，称为内啡肽 (endorphin)，如β-内啡肽等。内啡肽具有与脑啡肽相似的镇痛作用。

许多报道认为针刺疗法的镇痛作用是促进体内此类阿片样物质生成之故。

吗啡是结合到像脑啡肽分子的同样受体上吗？在结构上，吗啡的μ-受体和神经肽的β-受体有什么关系？这些问题很难得到准确的回答。因为在局部解剖学上尚没有足够的资料（或数据）可说明受体部位的化学结构。但也不排除借助药物的别位微拢作用（allosteric perturbation），使μ-受体和δ-受体之间发生互变的可能性。

基于NMR的证据，Roques提出蛋脑啡肽的三维结构。蛋脑啡肽分子呈U形排列，Tyr、Phe和Met三个氨基酸的指向离开肽的主干。至少是通过一个分子内氢键的作用维持此五肽（蛋脑啡肽）的β-转向卷曲形式，同时苯丙氨氨酸（phe）残基的亲脂性侧链要保持与受体表面的接近，以利于附加的相互作用。粗看起来，高度柔韧的蛋脑啡肽结构似乎不具备像吗啡那样的经典结

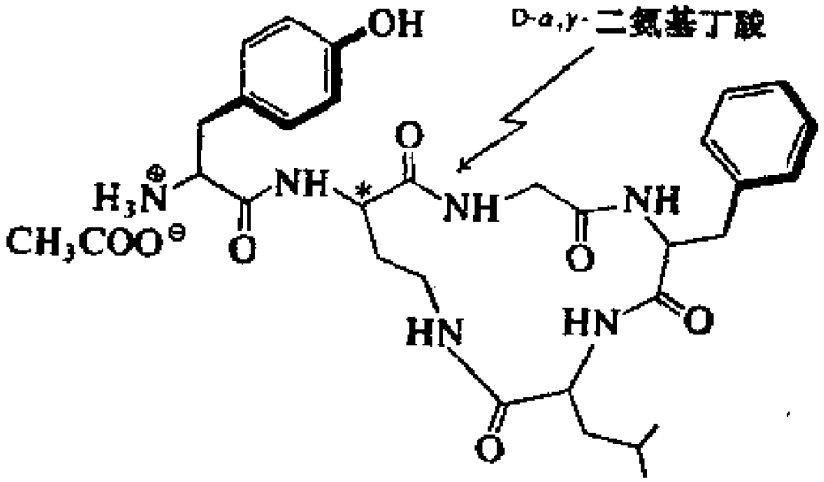


构。然而，在化学上发现，吗啡分子能迭加在蛋脑啡肽的N-端部分。而且，另一个有镇痛活性的生物碱东罂粟碱(oripavine)也能相当好地与此多肽主干相符合。

从这种分子间相应性比较方法的运用，可以得出这样的规律：凡能较好地与脑啡肽N-端部分相吻合的分子将会有显著的μ-受体特异性，而那些与C-端重迭的分子将倾向于具有较大的δ受体特异性。这实质上是在构象水平上的适应性反映，是阿片受体分子识别的化学本质。

近年来，^{15}N-和 ^{13}C-NMR 的研究结果提示，脑啡肽的伸展构象，与前面提出的β-转向弯曲结构有明显差别[5]。而这个发现与亮脑啡肽的X-射线研究较为一致[6]。事实上，此肽链的可折迭性还取决于溶剂。脑啡肽是一个能采用几个较低能量的不同构象的柔韧分子。

脑啡肽的肽链可作各种修饰。例如，人们制备了各种各样具有修饰氨基酸序列的四肽和五肽以及环脑啡肽类似物，分析它们的构效关系[7、8]。由分子模型显示，有可能发展对脑啡肽受体具有选择性的环多肽。而且，对这些环肽里某些氨基酸进行修



Tyr-cyclo[N^{γ}_{α}-D-A_2bu-Gly-Phe-Leu]

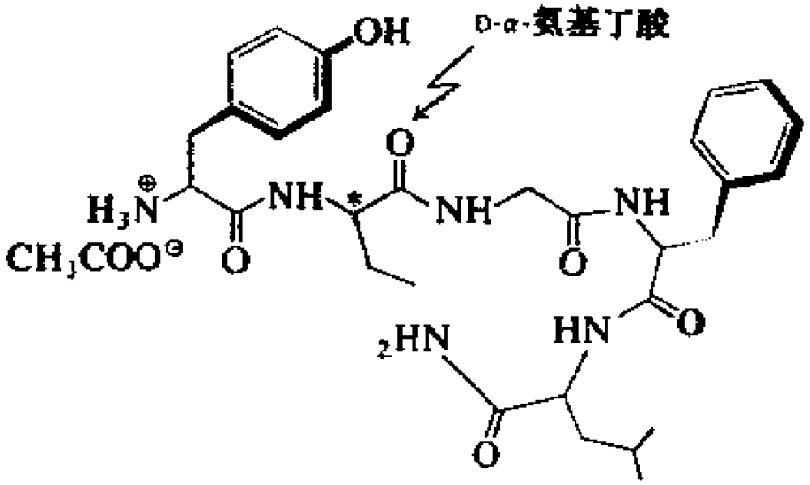
K_i^{δ}/K_i^{μ} = 8.3

(μ-选择性

Na^t-D-A_2bu为 D-a，r-二氨基丁酸

饰，有可能得到有效的、具有选择性的新型多肽。这也是肽类药物发展中的一个主要目标：设计和合成对于特定类型受体具有高度选择性的神经肽类似物。

下面介绍一些代表性的实例。比较某些脑啡肽的类似物与来自兔脑组织匀浆的μ-或δ-特异性受体的效能。



[D-Abu^2, Leu^5]脑啡肽酰胺

$K_i^{\delta}/K_i^{\mu} = 0.73$

由以上两个例子说明构象上受限制的类似物常在μ-受体选择性*上显示高的能力，而开链肽对μ-受体和δ-受体显示接近相等的亲和力。的确，由生物测定和结合分析结果揭示：与线形肽比较，在脑啡肽类似物分子里，通过关环产生的构象约束是它本身δ-特异性降低的直接和唯一的原因。刚性结构的缺乏，可能是许多天然神经肽对受体低选择性的原因。

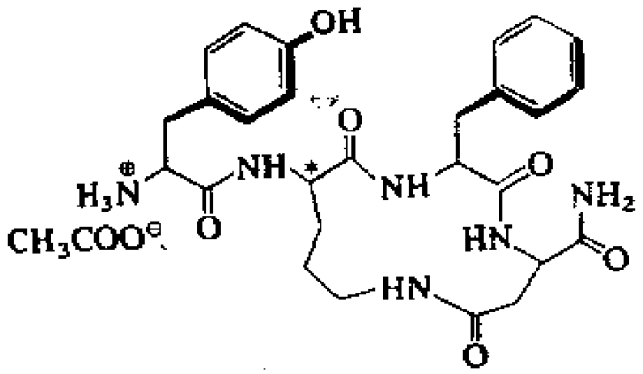
还有更多的实例可说明，用不同类型的环合反应所产生的构象限制的精细变化，能导致环脑啡肽类似物表现出各种程度的受体选择性。

包含半胱氨酸的环状肽（$X = NH_2$）——一个半胱氨酸桥的

---

* 药物与δ-及μ-受体结合的解离常数之比（Ki^{δ}/Ki^{μ}）大于1为μ选择性；接近于1，无选择性。

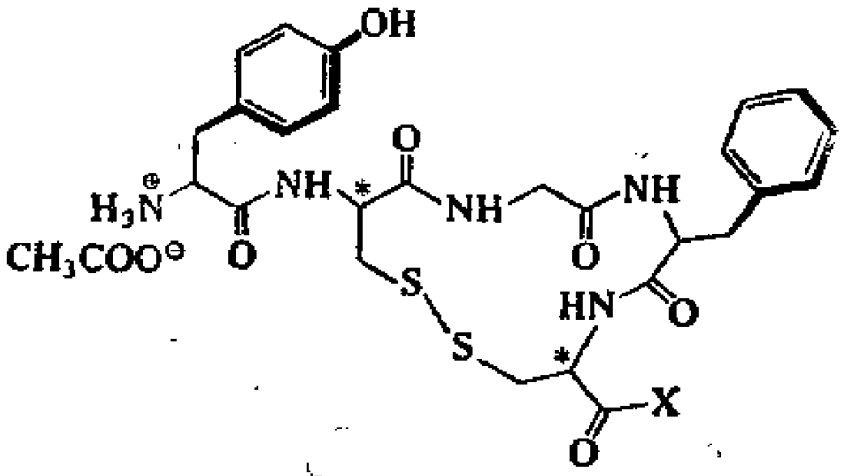
脑啡肽类似物，被发现在豚鼠回肠的试验中像〔Leu^5〕-脑啡肽一样有效，但无选择性。具有游离C-末端羧基(X＝OH）的环状肽与天然脑啡肽相比，明显提高了δ-受体的选择性。然而，含有一个颇有点刚性的十三员环状结构的环四肽类似物，显示一种高μ-受体选择性，而对δ-受体显示很弱的亲和力。



H—Tyr—D-Orn—Phe—Asp—NH_2

K_i^δ/K_i^μ = 213

较小环，μ-选择性



H—Tyr—D-Cys—Ala—Phe—D(or L)-Cys—X

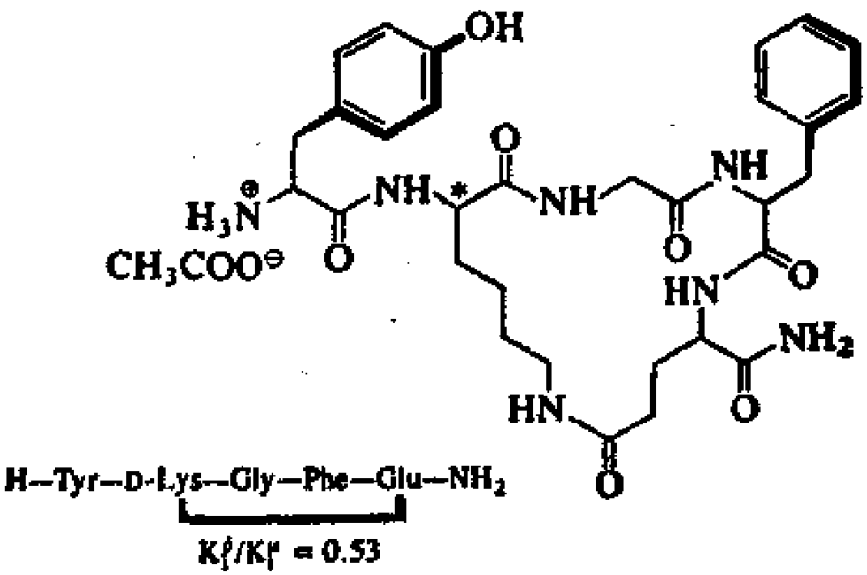
X = NH_2

X = OH

* ≡ D 构型

根据这些结构和至今得到的各种各样的环肽来看，似乎是包含比较小的刚性环结构（13或14员）的阿片肽比相应的线形类似物更有选择性，而具有较大的、更柔韧环结构的环肽类似物的情

况则刚好相反，例如，H-Tyr-D-Lys-Gly-Phe-Glu-NH_2具有类似于包含半胱氨酸类似物的一个较大的环，对μ-受体和δ-受体都显示高的亲和力，因此也是无选择性。



偶极的相互作用也必然在受体的特异性上起着决定性作用。因为亮脑啡肽在C-末端具有一个 Arg^+—Arg^+ 顺序残基时，表现了μ-受体选择性的增加，而在C-末端具有Asp^-—Asp^-顺序残基的相应类似物则具有显著δ-受体亲和力。

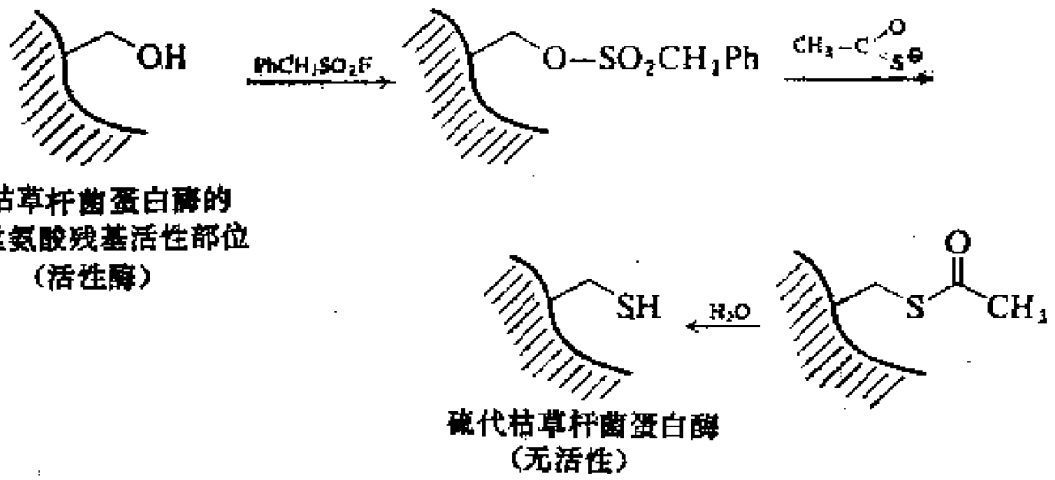
总之，这些研究导致了一个假设：构象的限制可以改变神经肽固有的活性。虽然许多环状类似物没有活性，但它们显示出极大的抗酶促降解作用。而且其中一些肽类有持久效应。因此，这些对于肽类药物的设计是有意义的启发。它代表了朝向发展神经肽模拟物的第一步。

2.5 化学突变

长期以来，医化学家们通过定量结构-活性关系(QSARS)的研究，尝试去确定酶抑制剂的最佳性质，即从立体因素、亲脂

性以及电性效应等方面去观察抑制剂如何与酶的活性部位进行更有效的结合。近年来，在模拟酶的催化作用方面又做了不懈的努力。那么，现在要问：设计或修饰酶的活性部位是否可能呢？回答：可以。通过改变在一种酶上的一个或更多氨基酸，使其产生新的催化作用，现在是可能的。这种方法称为蛋白质和酶的位置-定向化学突变（site directed chemical mutations）简称为点化学突变。

1966年 Koshland 等首先报道了进行酶的结构修饰工作[9，10]。他们使用一系列化学反应改变枯草杆菌蛋白酶（subtilisin，一种细菌的丝氨酸蛋白酶）的丝氨酸残基活性部位的羟基成为巯基。这相当于由一个半胱氨酸代替丝氨酸。然而，生成物—硫代枯草杆菌蛋白酶对正常底物却无活性。此后，有人进行了反向操作，即用丝氨酸残基代替木瓜蛋白酶的活性半胱氨酸残基，结果得到一个活性酶[11]。



类似地，还有α-糜蛋白酶的102-天冬氨酸转换成天冬酰胺，酶仍保持某些活性。但溶菌酶的52-天冬氨酸的羧基转换成伯醇后，则完全变成了无活性的酶。

所有这些位置-定向的修饰，对于阐明酶的作用机理是有用的。然而有这样一个问题：氨基酸残基的化学修饰，往往需要使

用人们通常想要避免的那种比较剧烈的条件，另外，这些方法往往是无特异性。为此人们一直在继续探索更有效和更适用的途径。下面仅对位置-定向诱变（site-directed mutagenesis）和化学突变（chemical mutation）作一介绍。

2.5.1 位置-定向诱变（点突变）

随着遗传工程技术的进展，使氨基酸在蛋白质分子上发生取代作用，现在是完全可能的，而且可在常规的工作基础上进行。这样的点突变涉及到基因的克隆，此基因的序列可由蛋白质的序列推断；它被掺入到合适的载体，如质粒中。由于这些DNA重组技术超出了这本书的范围，在此不深入赘述。

为了试图改变酶的底物特异性，化学家和生物化学家研究了枯草杆菌蛋白酶的许多突变体（mutants）[12]，枯草杆菌蛋白酶是肽链内切酶，可由多种枯草杆菌产生。这种酶只断裂邻接中性氨基酸的肽键，所以谷氨酸是枯草杆菌蛋白酶最不利的底物之一，它只具有16$mol^{-1}\cdot L\cdot s^{-1}$的Kc/*Km值。对比之下，酪氨酸是枯草杆菌蛋白酶适宜的底物，Kc/Km值接近$10^6 mol^{-1}\cdot L\cdot s^{-1}$。

从X-射线工作和模型研究结果表明，底物中谷氨酸残基的负电荷侧链和酶的活性中心的谷氨酸残基(Glu-156)之间有一种不利的静电相互作用。正常情况下Glu-156是通过离子对的作用稳定中性底物水解时的正四面体中间体。Glu-156修饰成谷氨酰胺(Gln-156)后产生一个突变体酶，其对谷氨酸底物的Kc/Km值*为260$mol^{-1}\cdot L\cdot s^{-1}$。另一种可能的改变是在酶上引入正电荷，以中和由谷氨酸底物的存在引起的静电相互作用。为此，将处于结合部位口袋底部的甘氨酸残基(Gly-166)改变成赖氨酸残基(在生理条件下，它的$-NH_2$基以质子化形式存在$\overset{+}{N}H_3$)。单独发生这个变化产生的酶，对于谷氨酸底物的Kc/Km值大于12 000$mol^{-1}\cdot L\cdot s^{-1}$。既包含Gln-156又包含Lys-166的双突变体

* 催化常数Kc与键合常数Km比值越大，作为酶的底物越适宜

具有的Kc/Km值为50 000$mcl^{-1}\cdot L\cdot s^{-1}$，这表示两个突变的效应不是独立的，至少在一定程度上是相互加和的。然而，此突变体与底物酪氨酸的结合能力并无增加（Km 不变），而且只是慢慢断裂它们的酰胺键。这些结果总结在表2.2

表2.2 枯草杆菌蛋白酶上位置-定向诱变

枯草杆菌蛋白酶	对Glu的Kc/Km ($mol^{-1}\cdot L\cdot s^{-1}$)	对Tyr的Kc/Km ($mol^{-1}\cdot L\cdot s^{-1}$)
天然的（在活性位置上三个残基为Asp-His-Ser）	16	10^{-6}
突变体Glu-156→Gln-156	260	
突变体Gly-166→Lys-166	12000	
双突变体	50000	低的

Gly-66和Glu-156都是位置-定向诱变的研究对象。实际上，Gly-166已被许多其他氨基酸所代替，例如：Ala、Ser、Thr、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Cys、Met和Pro等均可代替 Gly-166。由 Genetech 的科学家们发展的这种技术称为胶卷式诱变（casette mutagenesis）。它允许一系列合成的寡核苷酸比较容易地插入到一个基因里，使用这种方法，能做到在酶的给定位置上所有十九个可能的氨基酸的取代[12]。

利用修饰的枯草杆菌蛋白酶还考察了其它方面的影响，如催化活性与 pH 的相关性。有时在酶上改变的结果，几乎是与最初预料的情况相反。

位置-定向诱变的使用，与酶的活性位置的化学突变相结合，将会大为增加设计更有效的半合成酶的可能范围[13、14]。那么酶的活性位置的化学突变的含义是什么呢？

2.5.2 化学突变和半合成酶

由 2.5.1 节可知，位置-定向诱变一般是指酶的活性部位上

的某个氨基酸被其它氨基酸取代而导致产生新的活性酶的过程。Whitesides在 1978 年研究了一种半合成酶的方法，它是基于修饰处于酶的活性部位上的某个氨基酸的功能基或辅酶的结构。他设计了一种新的催化剂，替换存在于蛋白质结合部位的辅酶类似物。这样利用了蛋白质或酶的结合特异性，但又体现了具有新的共价连接的辅酶因子的特征[14]。以这种方式产生类似 酶 分子或半合成酶的过程称为化学突变。

运用这种方法，用黄素（flavin）衍生物，通过对木瓜蛋白酶的 Cys-25 活性部位上的巯基进行共价修饰，制备了黄素木瓜蛋白酶（flavopapain）。这种设计首先是以共价的木瓜蛋白酶-抑制剂络合物的X-射线衍射的研究为基础的。根据模拟结合的相互作用，而制备的黄素-木瓜蛋白酶复合物。（结构见图2.13）罕有未破坏其酶的催化活性的。

黄素木瓜蛋白酶 FP-3 是制备出的第一个有效的半合 成 类似物[15]。在N-烷基NADH衍生物的氧化反应里，其Kc/Km值几乎比观察的相应的模型反应的速率常数大两个数量级，蛋白水解酶基本上转变成进行氧化还原反应的酶。这种新的半合成酶显示了饱和性的动力学行为，这正如酶促反应所预料的，必须有结合部位的参与。

看上去FP-3是比 FP-2 和 FP-1 更好的催化剂，如图2-14所示[14]：首先来自黄素酰基侧链的羰基可与邻近的 Gln-19 及Cys-25的酰胺键的—NH_2间形成氢键，同时，FP-3分子也参与与Trp-26 的电荷转移的复合物。这样既可使其在活性部位被稳定（可见图2-14A），又不妨碍黄素酶(flavoenzymes)在疏水的空穴内嵌入酶与 NADH 类似物的 Michaelis 复合物（见图2-14B）。其次，生物物理的测定揭示，在与 NADH 类似物发生氧化还原反应之前，FP-3的黄素部分和芳香氨基酸Trp-26 之间的电荷-转移复合物已经被分裂，黄素可直接位于烟酰胺底物之上生成〔ES′〕中间体，前-R氢被转移到黄素核的N-5位置（见图2-

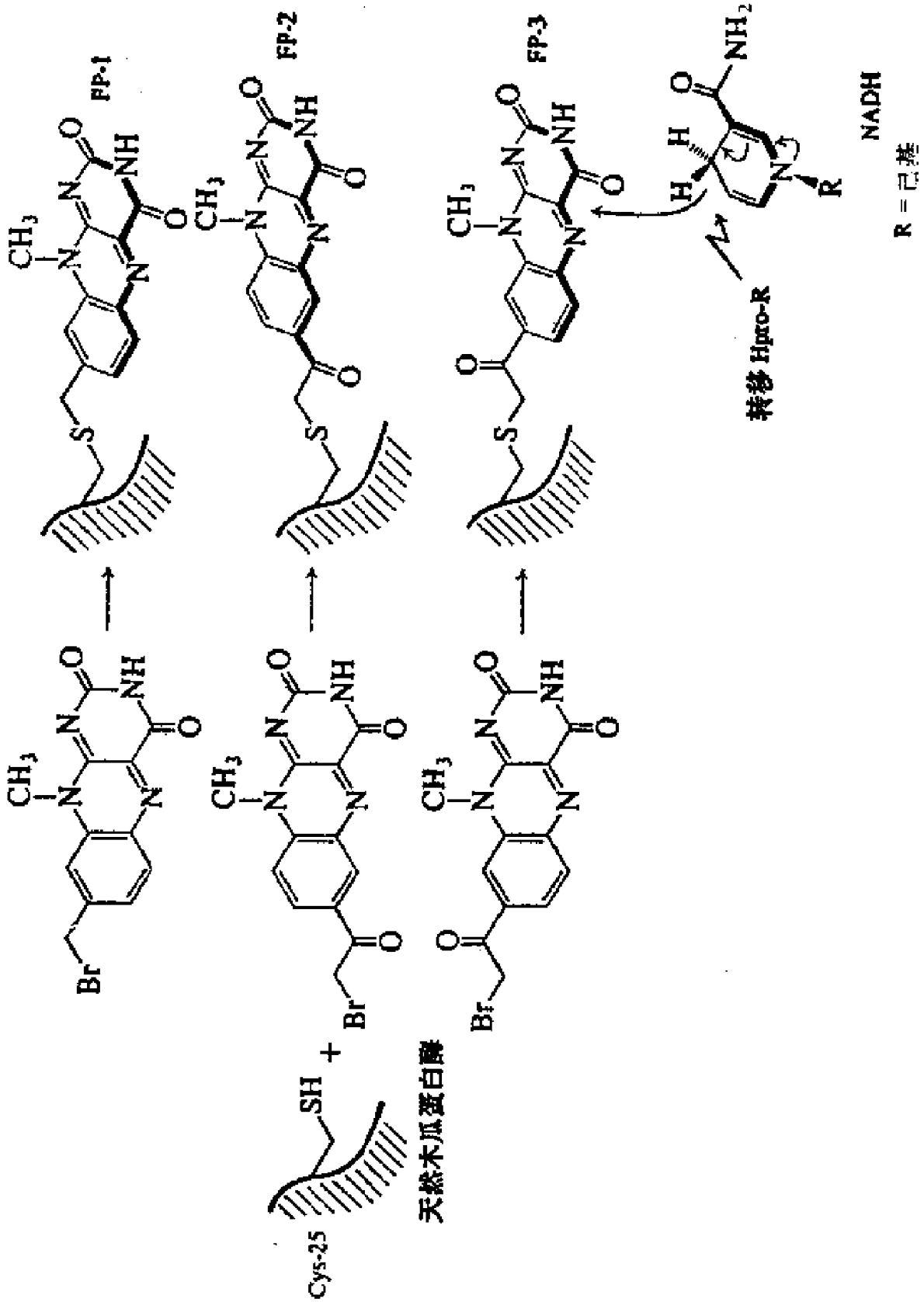


图2-14　黄素木瓜蛋白酶的形成

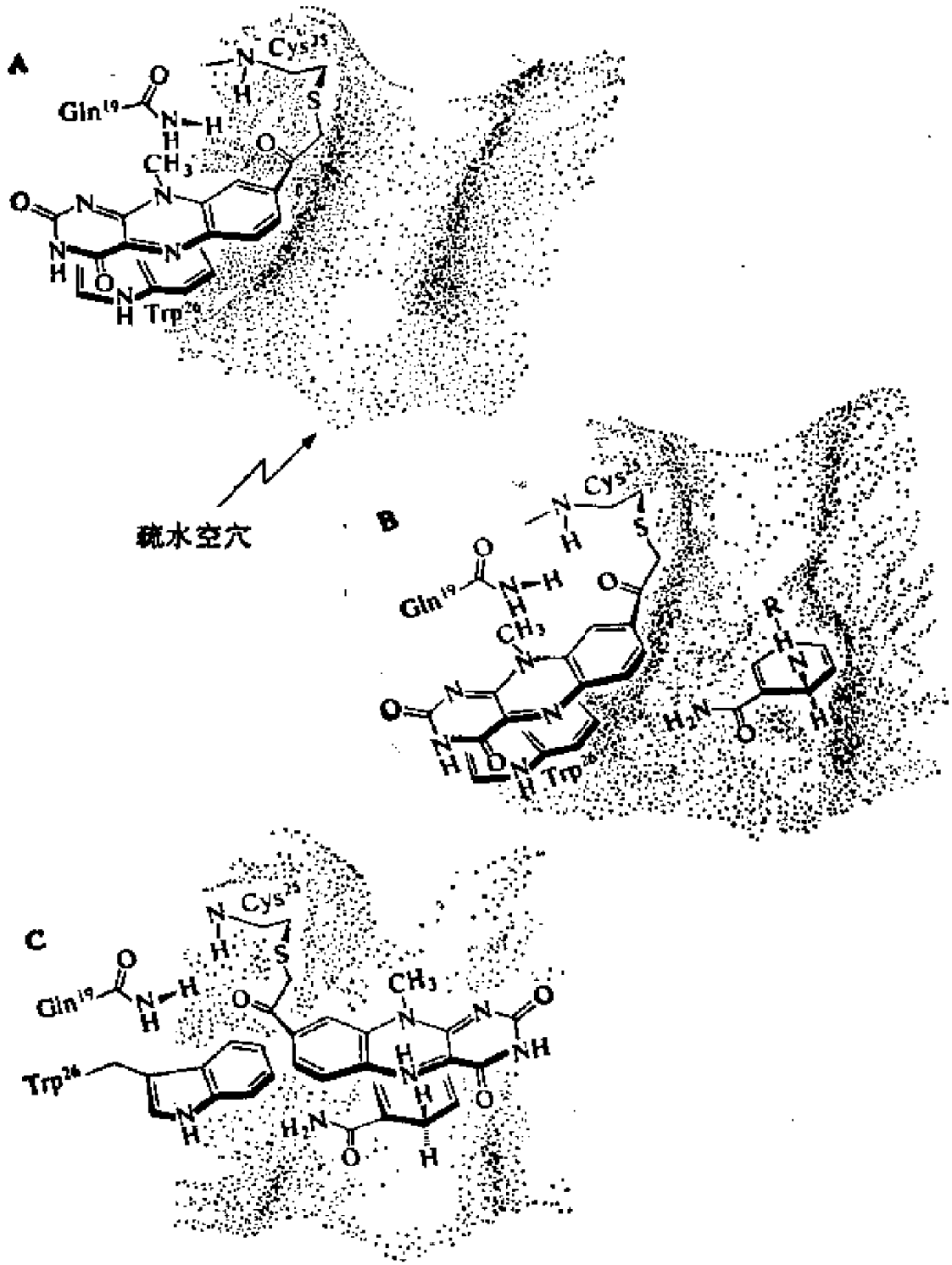
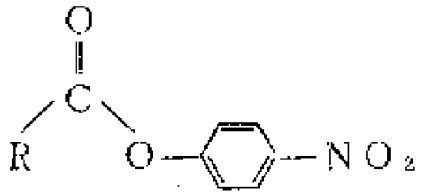


图2-14　黄素木瓜蛋白酶FP-3的活性部位

14C）。

Zemel以类似的方法但从不同角度证实从非酶的蛋白质能制备半合成酶[16]。使用的物质是移去辅基-血红素的抹香鲸的蛋氨

酸肌红蛋白（Met-myoglobin），结果脱辅基的载脂蛋白（apo protein）具有一个疏水空穴，类似容纳疏水底物的酶的结合部位。在蛋白酶中，咪唑残基可催化酯水解。在蛋氨酸肌红蛋白的这个新的空穴内，有两个组氨酸残基，基本上能履行水解的活性。正像预料的，疏水空穴与催化基团的结合，能对下列结构的脂肪酸酯产生极好的水解能力。



$R = C_5H_{11}$（己酸酯）

$R = C_9H_{19}$（癸酸酯）

新的蛋白质催化剂显示了饱和动力学行为，它的Kc/Km 值为 $600M^{-1}\ Sec^{-1}$，水解作用的速度比咪唑本身大3000倍。

总结起来一个有效的半合成酶的设计，应具备以下条件[14]：

1. 被使用的酶应是容易以高纯度的形式得到的。

2. 酶的X-射线结构应是已知的。

3. 使用的酶在活性部位或接近活性部位应有一个适宜的有反应活性的氨基酸功能基。

4. 酶的共价修饰应在天然酶的活性特征上产生明显的变化。

5. 附着在半合成酶上的辅酶类似物应不阻碍底物进入结合部位。

此外，作为化学修饰剂的合适辅助因子类似物的选择也应该满足下列三个基本标准：

1. 当辅酶结合到酶的活性部位上，就应具有作为催化剂的潜在作用，毋需酶的氨基酸残基的特定功能基参与催化。

2. 模型建造还指示共价结合的辅酶能够与潜在的底物间以有利于反应进行的方式相互作用。

3. 模型建造指示辅酶的置入应与酶模板空间要求相容。

吕以仙

第 3 章　磷酸酯和核苷酸的生物有机化学

3.1　结构和性质

在活细胞的各个组分中，核酸是最为关键的。它包含了遗传信息，并参与这种遗传信息在细胞内的表达，从而促成代谢过程及其控制。

核酸的生物功能是多方面的。DNA 是遗传物质基础，负责遗传信息的贮存和发布。遗传基因就是 DNA 链上若干核苷酸组成的片段。RNA 负责遗传信息的表达，它直接参与蛋白质的生物合成，它转录 DNA 所发布的遗传信息并将之翻译给蛋白质，使生长、发育、繁殖和遗传得以继续进行。

通过 DNA“复制”（合成），遗传信息从亲代细胞传递到子代细胞。遗传信息贮存在 DNA 中，在需要的时候换成适当的信息，以便合成具有某种特征的蛋白质，这一过程称为“转录”。遗传信息被转录到RNA（信息RNA或mRNA）生物高分子上，依次与特定的氨酰 -tRNA 相互作用导致氨基酸的有序结合。遗传信息从 RNA 转录到特定的氨基酸序列，称为“翻译”（从核酸译成氨基酸）。整个过程简要描述如下：

$$\text{DNA} \xrightarrow[\text{(全程合成)}]{\text{复制}} \text{更多的 DNA}$$

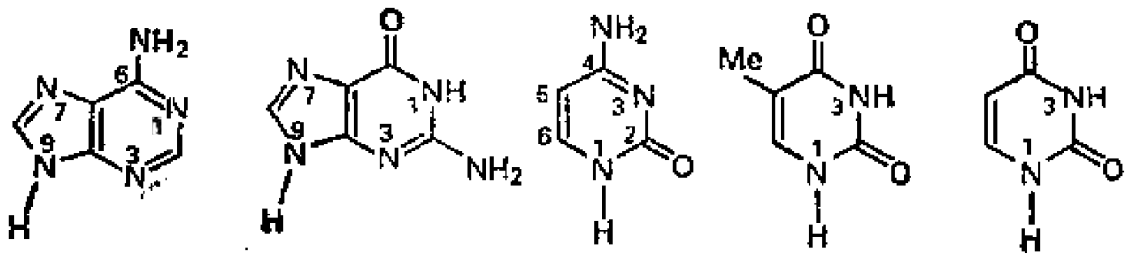
$$\text{DNA} \xrightarrow{\text{转录}} \text{RNA} \xrightarrow{\text{翻译}} \text{更多的蛋白质}$$

正如氨基酸的侧链决定其化学功能一样，核酸中嘌呤、嘧啶碱携带遗传信息，认识这一点是非常重要的。核酸中，平面的嘌

呤、嘧啶环近似垂直于糖环所在的近似平面，这样，DNA 双螺旋的碱基可以上下平行排列，层层堆积，成为 DNA 结构稳定的主要力量。碱基之间的疏水键进一步稳定双螺旋结构。正是由于 DNA 是一种独特的稳定的高分子结构才能承担贮存大量遗传信息的职能，作为数据库，才不致使常规的细胞程序打乱。

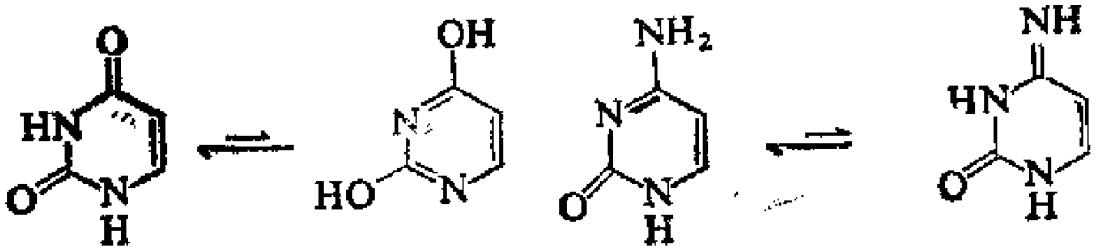
3.1.1 嘌呤和嘧啶碱基

核酸中主要的碱基有腺嘌呤(adenine)、鸟嘌呤(guanine)、胞嘧啶 (cytosine)、尿嘧啶(uracil)和胸腺嘧啶 (thymine)。



腺嘌呤　　鸟嘌呤　　胞嘧啶　　胸腺嘧啶　　尿嘧啶

它们可发生酮式-烯醇式或胺式-亚胺式的互变异构。在含氧碱基中，多数情况下酰胺的共振能超过了芳香环的共振能，因而氧原子主要以酮式存在。但在含氨基的碱基中，氨基为主要存在形式。光谱测定表明，五个主要的碱基在生理pH下，99.99%以上以酮式或胺式存在。例如尿嘧啶和胞嘧啶的互变异构如下：



尿嘧啶　　胞嘧啶

这些含氮杂环化合物本身水溶度很小，但当组成核苷和核苷

酸后，水溶度大大增加。

嘌呤和嘧啶碱基的酸碱解离行为对其荷电状态、互变异构的结构并由此产生的受、供质子的氢键都有重要影响。对于含氨基的碱基，环外氨基的碱性很弱，这与苯胺的情况类似，氮原子上未共享电子对离域到环上，从而降低了碱性。碱性主要反映在杂环N上。表3-1的数据可以说明，在生理pH下（5＜pH＜9），核苷及核苷酸在碱基部分是不带电荷的。

表3-1　在核苷和核苷酸中常见碱基的 pKa 值*

碱基（质子化部位）	核　苷	3′-核苷酸	5′-核苷酸
腺 嘌 呤　(N-1)	3.52	3.70	3.88
胞 嘧 啶　(N-3)	4.17	4.43	4.56
鸟 嘌 呤　(N-7)	3.3	(3.5)	(3.6)
鸟 嘌 呤　(N-1)	9.42	9.84	10.00
胸腺嘧啶　(N-3)	9.93	—	10.47
尿 嘧 啶　(N-3)	9.38	9.96	10.06

* 在约20℃，不存在盐的条件下测定。

pKa＜6的值表示其共轭酸的pKa值。

3.1.2　糖环的构象

对于五元糖环，确切地说，分子不是平面而是处于半椅式。若以C1′-O1′-C4′构成平面，可考察C-2′和C-3′在此平面外的各种构象。平面两侧可分为内（endo-）和外（exo-）。“内”是指与C-5′和碱基同侧，而“外”是指与C-5′和碱基异侧。在半椅式构象中，C-2′和C-3′分别处于两侧并且都有处于内或外侧的机会。当C-2′处于内侧的程度大于C-3′处于外侧的程度时的构象称为C^{2}′-endo，反之，当C-3′处于内侧的程度大于C-2′在外侧的程度则称为C^{3}′-endo构象。这是两种极限，还有无数多种构象存在于二者之间。在天然的核酸从一种构象变成另一种时，对生物学功能会产生一定的影响。正常的 B-DNA

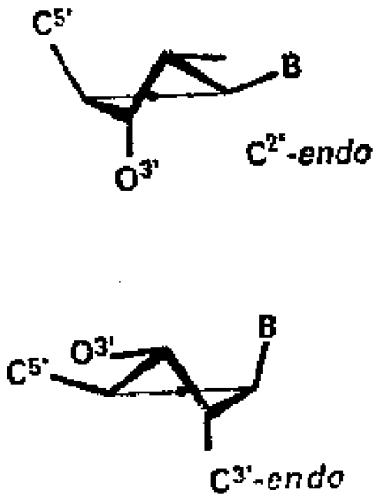


图3-1 糖环的构象

（右手螺旋体）是C²′-endo构象，RNA是 C³′-endo 构象。

3.1.3 碱基和糖环的关系

核酸中的碱基和糖环之间是以 β-糖苷键相连，碱基近似地垂直于糖的近似平面，平分O4′-C1′-C2′键角，并且使碱基与糖环间有两种构象。当较小的嘧啶环H-6或嘌呤环H-8处于糖环上方时为anti-构象，当较大的嘧啶环 O-2 或嘌呤环 N-3 处于糖环上方则为syn-构象。一般来说反式构象占优势，但由 NMR、

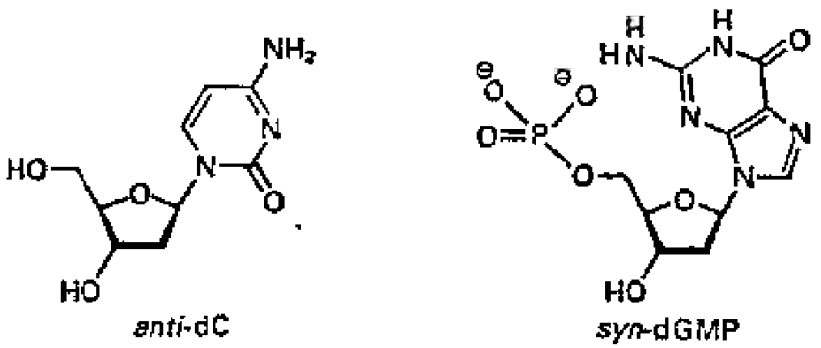


图 3-2 去氧核苷(酸)的构象——anti-和syn-

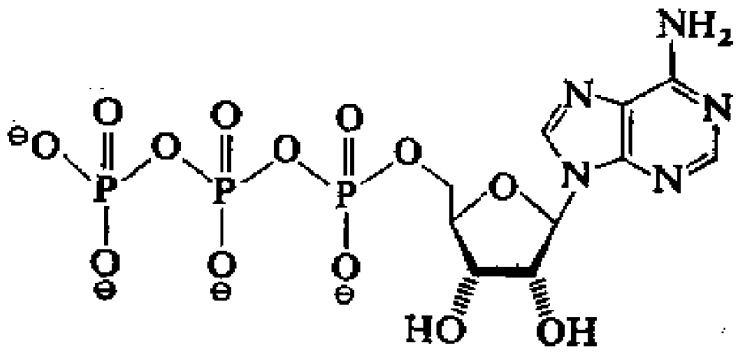
CD和 X-射线分析，发现在鸟嘌呤单核苷酸、交替的寡核苷酸 d(CpGpCpG)和 Z-DNA（左手螺旋体）中是syn-式糖苷键为

主，根据理论计算认为这是由于磷酸的负离子和鸟嘌呤的C-2氨基之间的静电吸引力所致。值得注意的是 syn- 式构象只能在Z-DNA 中存在。

3.2 单核苷酸

3.2.1 ATP

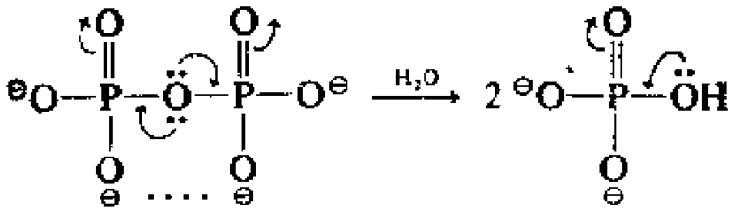
ATP（三磷酸腺苷）有生物能源库的功能，借助ATP能够合成许多生物化学上重要的化合物。其高能量来自三磷酸酯链的酸酐结构，而 ATP 分子中腺嘌呤部分的功能是识别其利用的各种酶以及作为和酶的连接部位。较简单的磷酸酐（例如乙酰磷



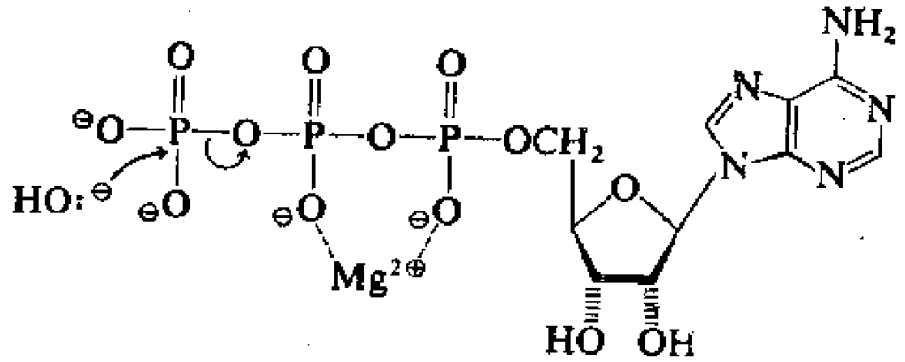
ATP

酸，焦磷酸）也具有相似的高能量。磷酸酐的这种活性可能是由于“竞争性共振”（Competing resonance）或者说是两个功能基（磷酰基和羰基）竞争氧原子上的未共享电子。在水解后这种竞争消除，并能观察到较大的共振稳定性，因此产物的形成是有利的。磷酸构成酸酐比构成酯有更强的亲电性，因而有更高的活性。因为在酯中，每个磷酰基享有一个氧原子，而在磷酸酐中则是两个磷酰基共享一个氧原子。在二或三磷酸酐水解后会减少酸酐链上多重负电荷的静电斥力，因此产物形成是有利的。

在生理条件（pH7.35）下，ATP 中四个酸性氢中有三个都



解离，第四个酸性氢 pKa 值为 6.5，因此也大部分离子化。在细胞内，这种多负离子型体可与镁结合形成 1:1 的配合物。在体外，ATP也可与Ca、Mg 和 Ni 等二价金属结合。除两个磷酸根的氧负离子外，腺嘌呤碱基（例如N-7位）也可参与金属离子的螯合作用。这种金属离子可作为 ATP 水解的催化剂。因为金属离子与磷酸根的结合会中和掉部分负电荷，使得亲核试剂（如 OH^-）的接近较容易。

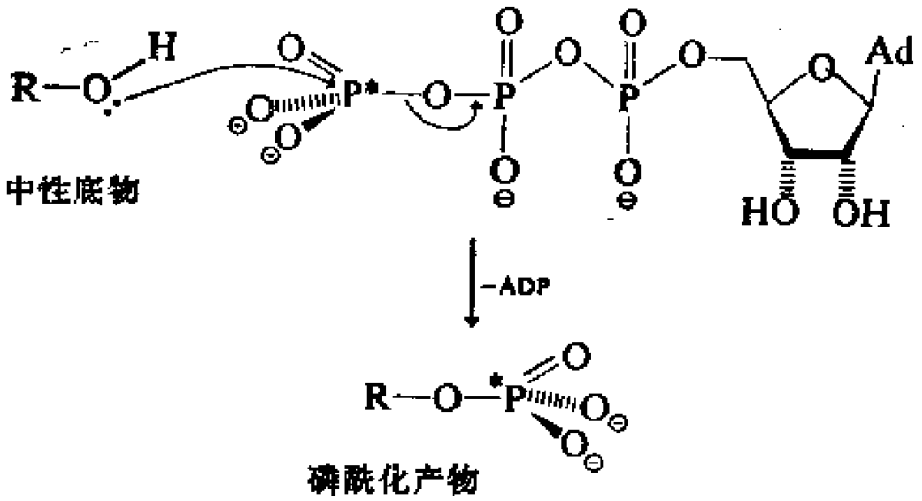


在标准条件下（pH7.0）γ-和β-磷酸盐水解的 $\Delta G^\circ_{水解}$大约 -31.2KJ/mol。在细胞内，$\Delta G_{水解}$ 约为 -50KJ/mol。总之，从生物系统内的化学反应意义上说，ATP 是一个高能化合物。这种定义是人为规定的：高能化合物是指在生理 pH 下，其$\Delta G_{水解}$超过-29.4KJ/mol，或$\Delta H_{水解}$超过 -25KJ/mol 的化合物。

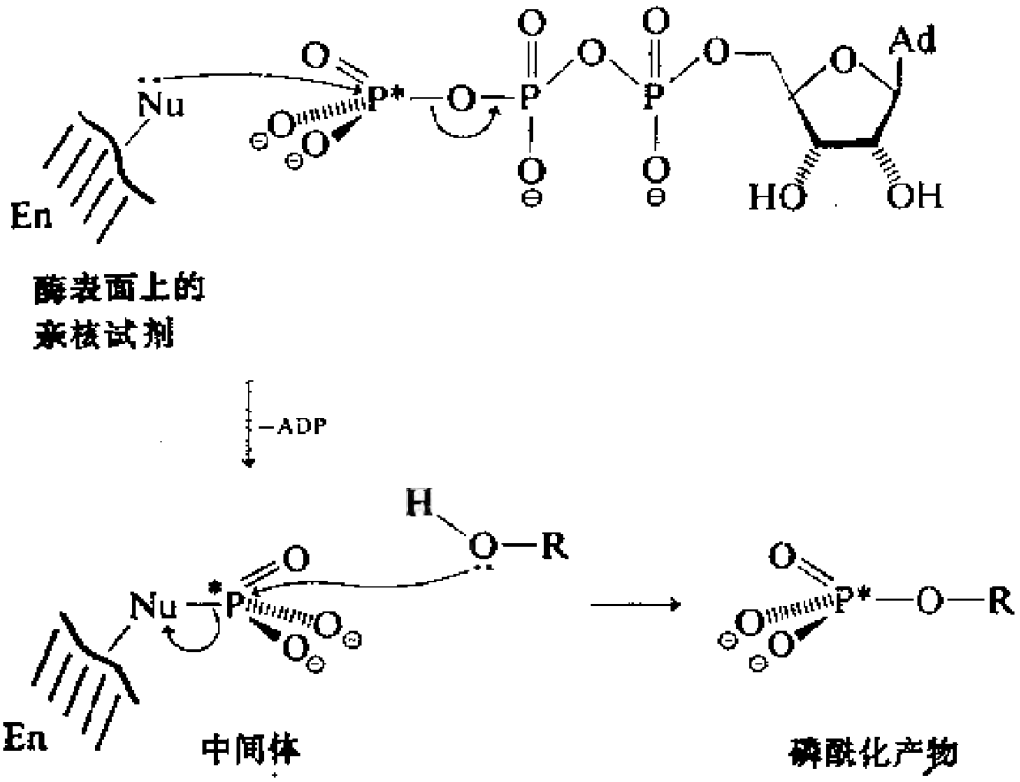
ATP 在生物磷酰化反应中作为磷酸根的供体。它能把势能转给生物化学上重要的化合物，例如形成肽键（经中间体酸酐）的能量可从ATP获得（见第二章）。

合成γ-手性磷的 ATP 对于磷酰化酶作用的立体化学及作用机理的研究是极好的探针。当底物对 ATP 的γ-磷进行酶促的亲

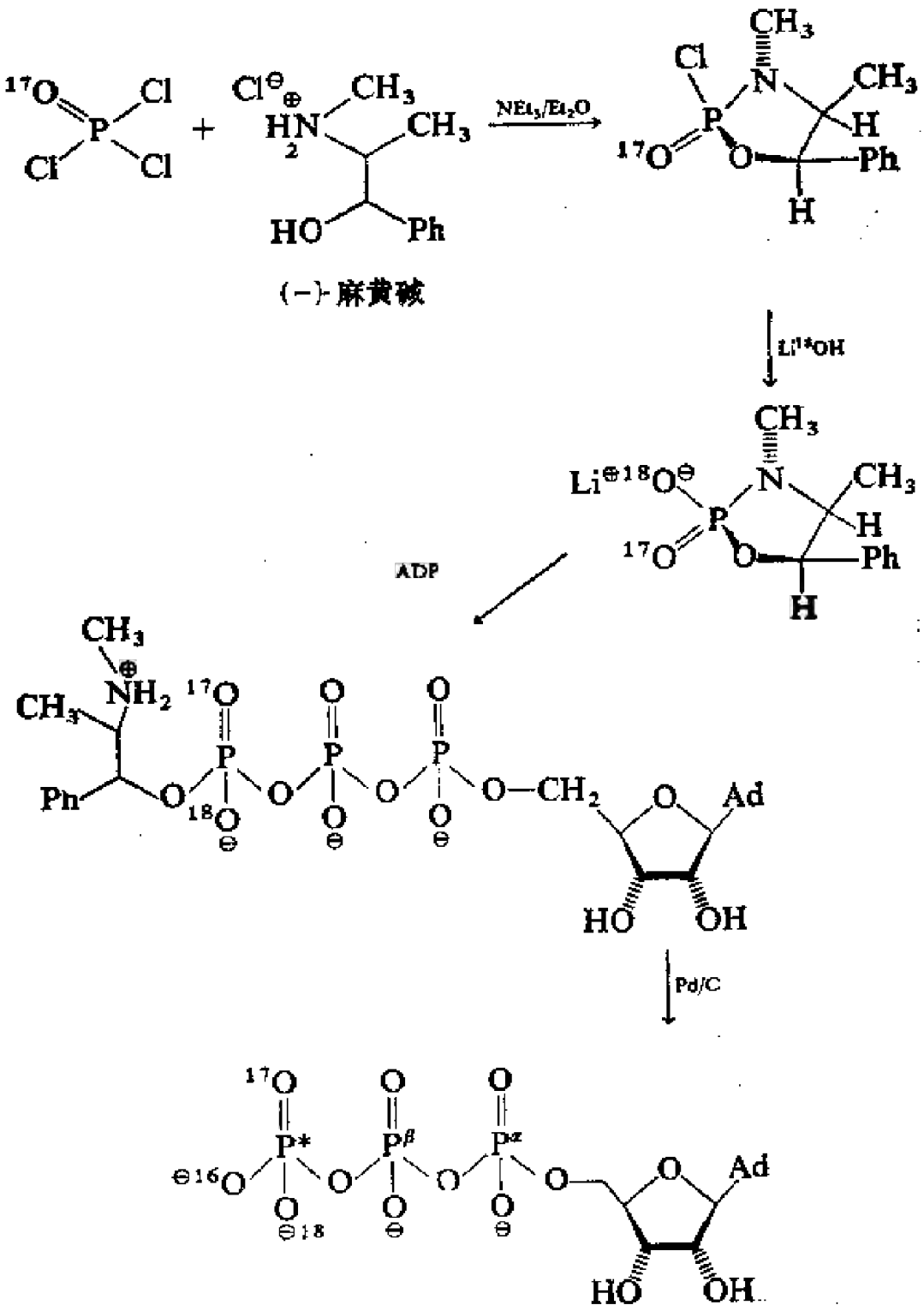
核性反应时，至少有两种途径。一种可能是经过在酶表面的直接简单的置换过程。按照此途径，产物中的手性 γ－磷的构型全部翻转：



另一种途径，酶可以首先被ATP磷酰化，形成酶-底物共价结合的中间体，然后中间体再被底物置换。净结果是构型保持：

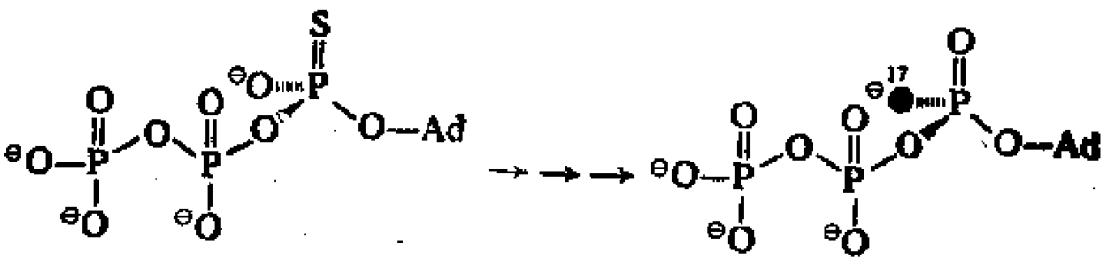


在甘油激酶、丙酮酸盐激酶和己糖激酶的例子中，观察到手性γ-磷的构型翻转[1]。



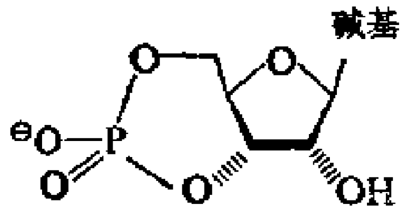
ATP 上为γ-手性磷的合成是由 Knowles 等完成的[2]。ADP 与同位素标记的一种磷酰化剂反应形成〔γ-^{16}O，^{17}O，^{18}O〕-ATP。用 ^{17}O 标记的三氯氧磷与（一）麻黄碱反应产生一活泼的五元环，此五元环可用 Li^{18}OH 反应，将其上的Cl置换。由于五元环的张力和对酸敏感的磷酰胺键，此中间产物是极好的磷酰化试剂，易与 ADP 作用产生手性γ-磷中间体，然后经磷酸苄酯键的催化氢解，得到手性γ-磷的 ATP（见前页）。

近来Lowe等合成了腺苷5′〔(R)-α-^{17}O〕三磷酸酯，是用一系列酶处理腺苷5′〔(S)-α-硫代〕三磷酸酯而获得[3]，可作为底物进攻α磷酰基的立体化学探针。



腺苷S-α硫代三磷酸酯　　　　R-α-^{17}O-ATP

3.2.2 cAMP 和 cGMP



环核苷酸，3′，5′-环腺嘌呤单核苷酸(cAMP)和3′，5′-环鸟嘌呤单核苷酸（cGMP）可调节细胞间的信息传递过程[4]。

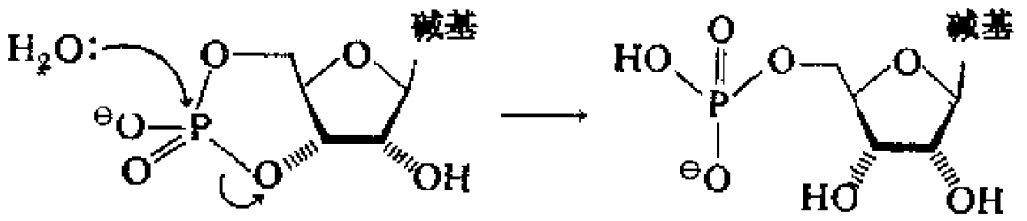
受环核苷酸调节。

cAMP和 cGMP 在代谢调节过程中往往起着相反的作用，即若cAMP在某过程中起了抑制作用，则cGMP就起兴奋作用。它们是作为第二信使对环境的（化学的）刺激产生生化反应。一个例子是人受惊吓时肾上腺素释放到血液中，随之引起血糖的增加。这个反应就是受第二信使 cAMP 的影响。

合成 cAMP 和 cGMP 的酶分别是腺苷酸环化酶和鸟苷酸环化酶。生成的环腺苷酸然后结合到蛋白激酶A上。蛋白激酶A由两个亚单位组成*，一个是调节亚单位，用于结合 cAMP，另一个是催化亚单位，可催化特定的蛋白底物的磷酸化。

还有很多酶受环核苷酸的调节作用，并且也与蛋白激酶的磷酸化作用有关，如酪氨酸羟化酶、RNA 聚合酶 I （哺乳动物的）、糖原合成酶、磷酸果糖激酶、鸟氨酸脱羧酶和 ATP 水解酶等。近年来有报导cAMP的C_8取代衍生物（如 8-Cl-cAMP）对恶性肿瘤的控制和逆转有一定作用[6]。

cAMP和cGMP的环磷酸环是高能结构，在pH7.3时与ATP的水解情况相比，可多释放 12.5KJ/mol 能量，水解产物为5′-非环结构

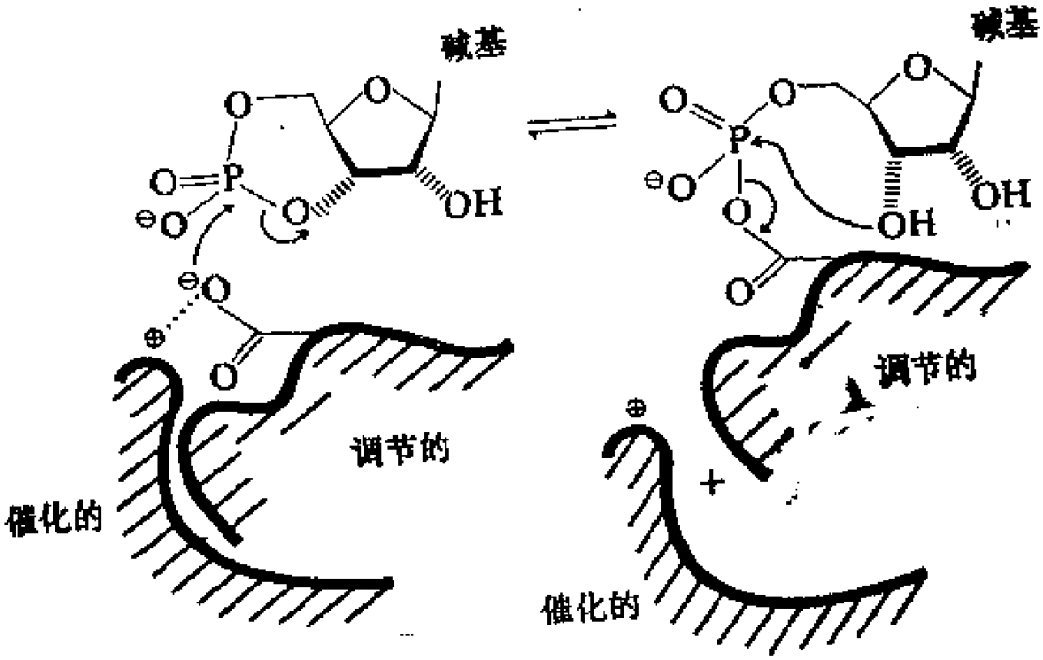


碱基＝腺嘌呤或鸟嘌呤

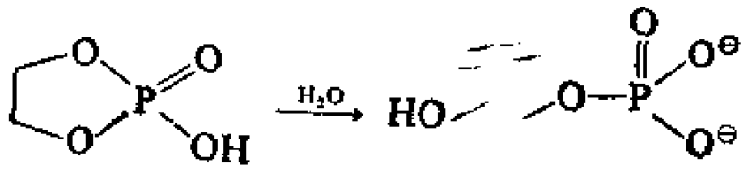
这些高能的环状结构对环核苷酸的生物功能的影响还不清楚，一般认为可能对于环核苷酸通过共价中间体结合到蛋白激酶的调节亚单位上是需要的，例如调节亚单位的羧基残基可打开环

* 后来的工作表明[5] 依赖cAMP的蛋白激酶A是由两个催化和两个调节亚单位组成的四聚体蛋白质称为 R_2C_2。依赖 cGMP 的蛋白激酶G是由两个相同的亚单位组成的蛋白．每个亚单位的多肽链上都有一个结合cGMP的位置和一个催化的位置。

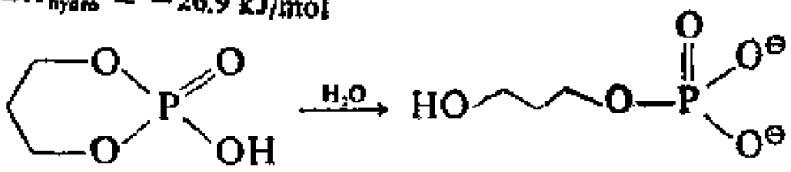
状磷酸酯键形成高能的中间体，随之又能破裂调节亚单位和催化亚单位之间的离子吸引力从而引起两个结构的分离：



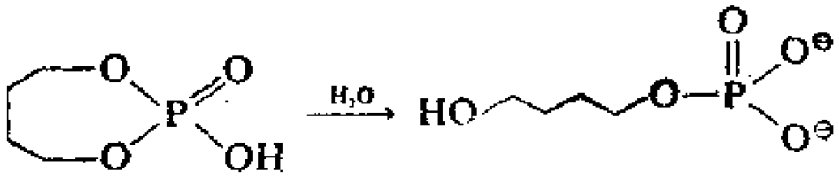
已知六元环磷酸酯不是典型的高能结构（与五元环不同），这可从亚乙基、三亚甲基、四亚甲基环磷酸水解时的热焓值说明：



$\Delta H_{hydro} \approx -26.9$ kJ/mol



$\Delta H_{hydro} = -12.6$ kJ mol

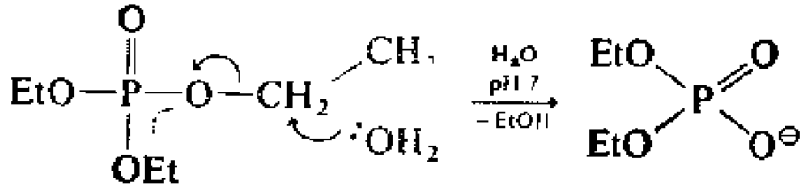


$\Delta H_{hydro} \approx 9.2$ kJ/mol

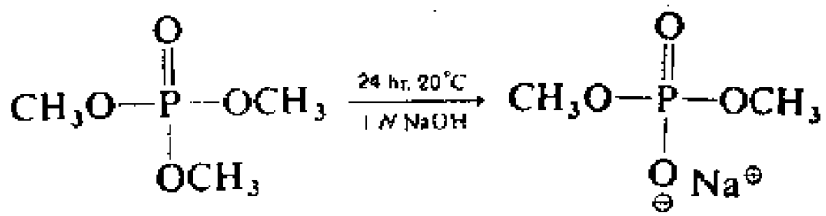
目前认为核糖的呋喃环的醚键氧原子反式稠合到六元环的环磷酸酯上与其高能含量是有关的，因为用吡喃环（葡萄糖）或环戊烷结构代替呋喃环得到的环磷酸酯的能量低得多。环核苷酸中碱基对它的高能含量无关。

3.3 磷酸酯的水解

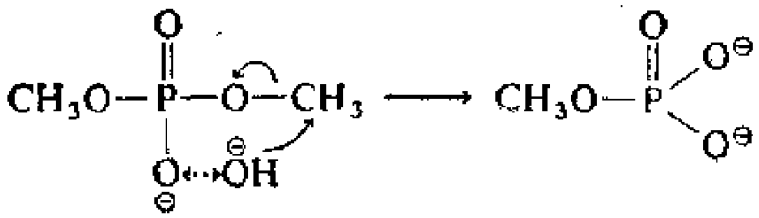
磷酸三酯易受酸或碱催化水解，经烷氧或磷酰氧二种可能的断裂方式。例如，磷酸三甲酯和磷酸三乙酯在中性的水中经 S_N2 机理的烷氧断裂，酸催化水解也经烷氧断裂过程：



磷酸三甲酯的碱催化水解通过磷酰氧断裂，并提供一种制备磷酸二甲酯的方法：



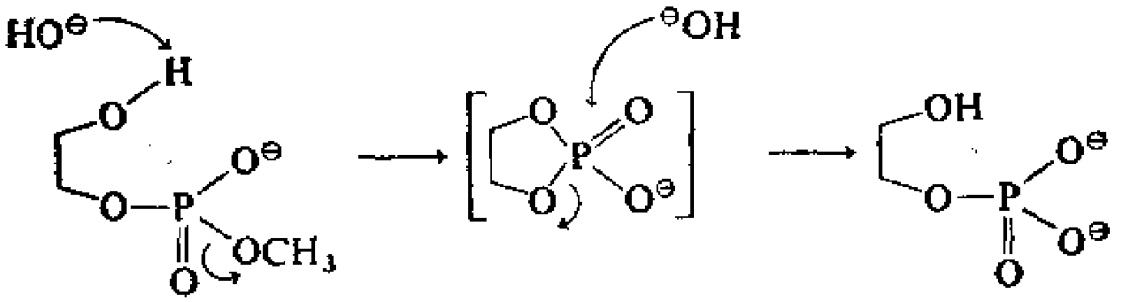
在产物磷酸二酯中，氧负离子与进攻的氢氧根间由于电性相斥，因此不易再水解成磷酸单酯。磷酸二酯在 100℃ 碱水解的半衰期为16天，并且由于磷原子不易被接近，产物的形成只经烷氧断裂机理：



磷酸二苯酯的碱性水解经磷酰氧断裂历程，但反应很慢，在中性水中100℃条件下水解的半衰期为180年！只有当苯氧基有较好的离去能力时，速度才增加，例如，磷酸-双-2,4-二硝基苯酯具有碱性较弱的离去基，水解速度明显增大。

以上资料很好地说明了为什么具有磷酸二酯键的 DNA 对水解具有较大的抗拒作用：在 100℃ 的 1N NaOH 溶液中，1 小时后未观察到DNA的降解。

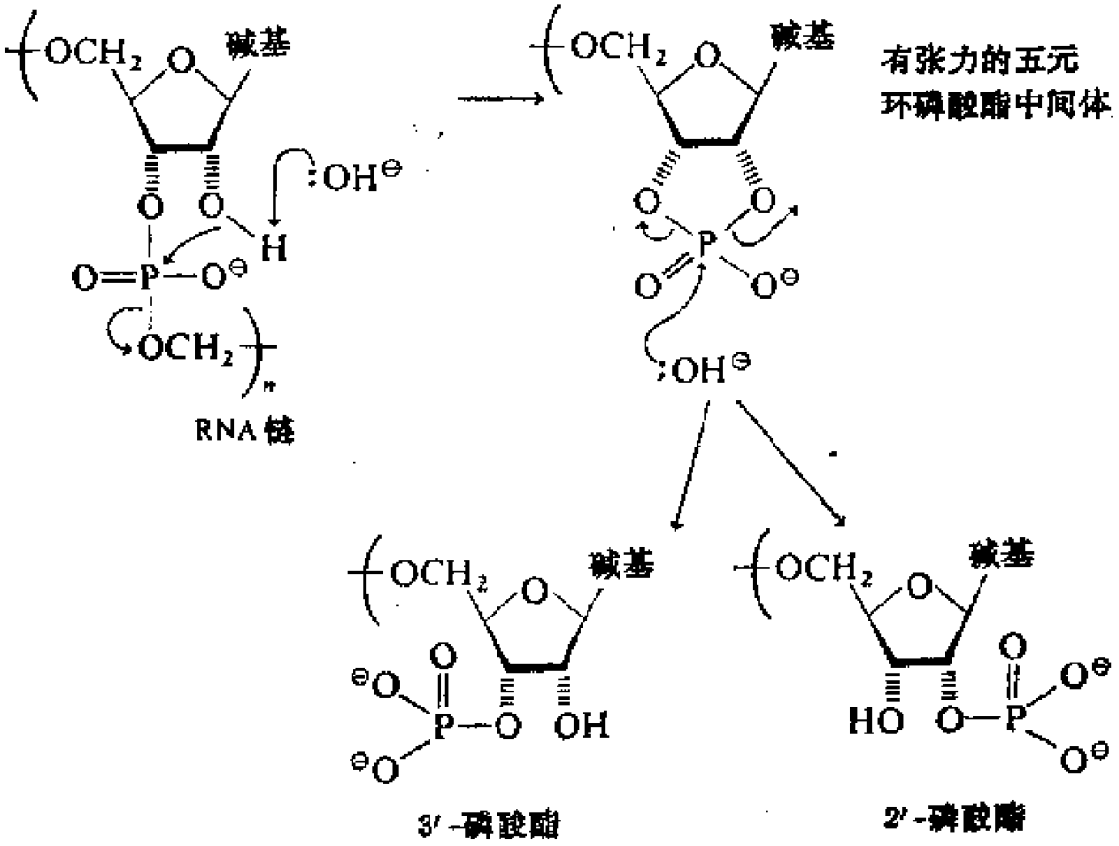
但是，同是磷酸二酯，2-羟乙基甲基磷酸酯却易遭受碱水解，在 1N NaOH 中，25℃时半衰期为25分钟。此现象可解释为：由于邻近羟基的分子内亲核性进攻（邻基参与作用），先形成有张力的五元环磷酸酯中间体，然后在氢氧根作用下水解破环：



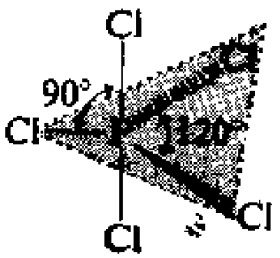
该五元环的水解速率是其开环类似物磷酸二甲酯的10^{16}倍，而且水解时有明显的放热，反映出环状结构内在的张力能。

以上事实同样说明了为什么 RNA 不稳定，容易发生降解：RNA 在 0.1N NaOH 中室温下即被降解生成2′和3′磷酸酯的混合物（见下页）。

磷酸酯水解机理常常写作似乎经简单的取代过程，其实是经 dsp^3 杂化的五配位中间体。这种中间体是典型的五个电子对围绕着一个中心原子（磷），构成三角双锥体。许多稳定的五配位磷化合物采取这种几何形式，例如气态的五氯化磷以三角双锥体存在，这种 dsp^3 杂化系统提供了五个不等价的成键波瓣，有两个磷-氯键键长长于其余的三个，前者为顶生键（apical，简称 a

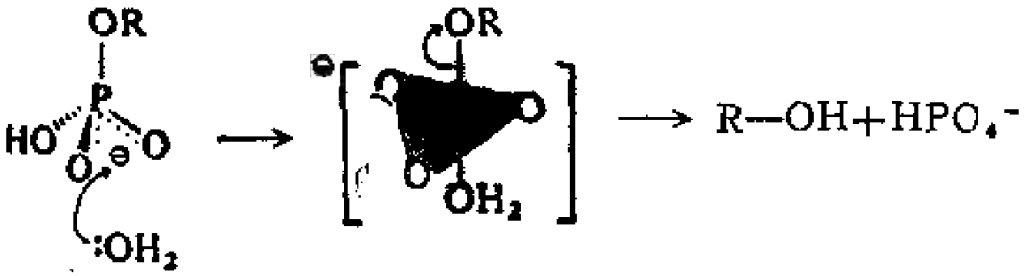


键),键长0.22nm，后者为平伏键（equatoral，简称e键），键长 0.20nm。三个e键的氯原子处于一个平面上．而另两个a键垂直于此平面。

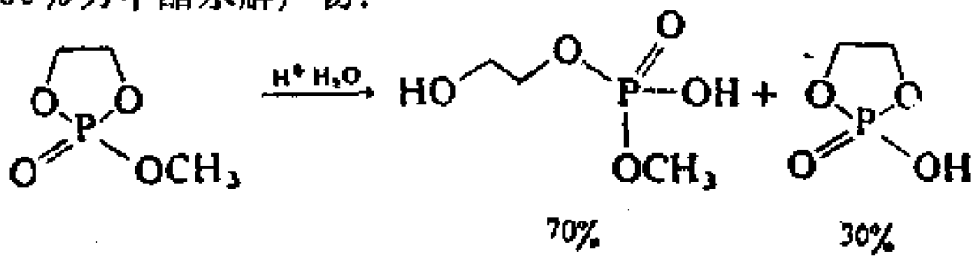


在正四面体构型的磷酸酯水解时，进攻基团会从即将形成的五配位中间体的a键方向接近，也就是在形成的中间体中，进攻基团形成的新键占据长键（a键）；同时，离去基团也必须从另

个 a 键方位上脱离。以下是对磷酸单酯水解历程的说明：

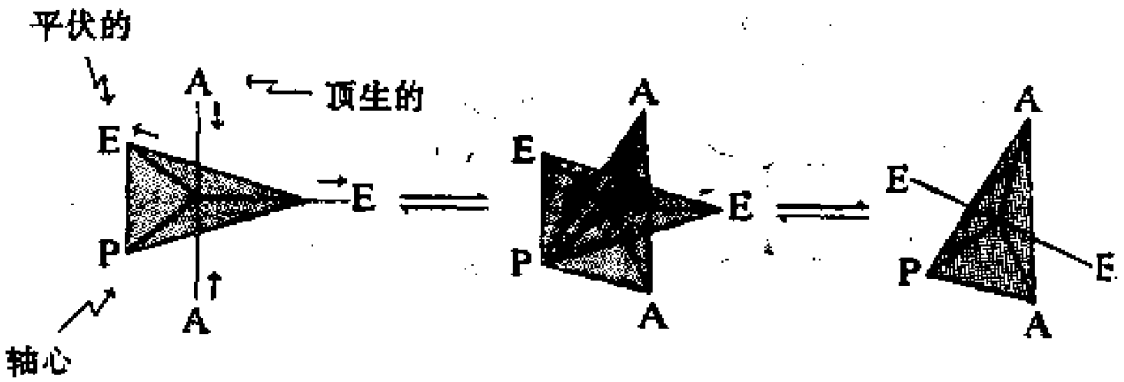


对于环状的甲基亚乙基磷酸三酯的水解，若是简单置换应得到打开五元张力环的单一产物，然而事实上，酸催化其水解产物中有30%为甲酯水解产物：



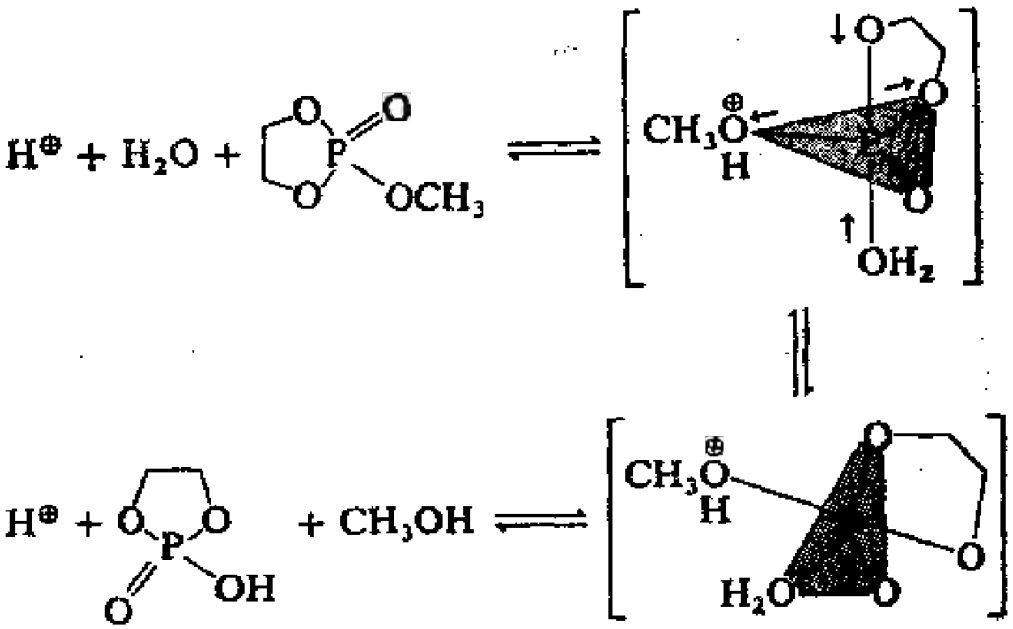
以上所见可用假旋（pseudorotation）[7、8]现象解释。Wastheimer 和 Dennis 1966 年提出了假旋发生时的规律，用来预料酯水解速度和推测酯的水解是否能在不开环的情况下发生。假旋是发生在五配位中间体反应中，磷-配体键的形变（deformation）过程。借助假旋，两个处 a 键的配体变成处于 e 键，同时，两个处 e 键的配体变成处 a 键。这种变化是可以理解的，因为共价键不是静态的实体，正如红外光谱所反映出的共价键能够经历种种弯曲和伸缩运动，因此这种形变是不奇怪的。在假旋期间两个 a 键的长度可以看作“向内挤压”以便形成两个新的 e 键，而三个 e 键中的两个（第三个在此过程中保持“中立”或键长不变被称为“轴心”）被拉长而形成两个新的 a 键。其过程如下：（“⟶”表示键长的增大或减小）。

假旋受五个“优先规则”支配：（1）磷酸酯类的水解经三角双锥体的五配位中间体历程。（2）在水解过程中，进攻基团

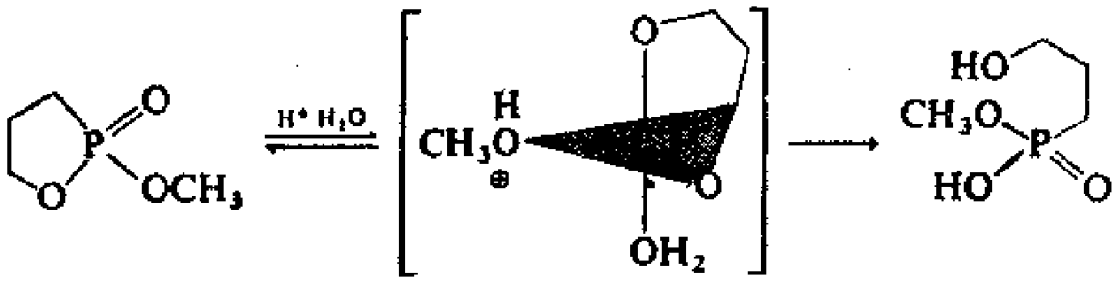


和离去基团均仅从 a 键位置上进入和离去。（3）由于张力，五元环中的两个 P—O 键不在两个 e 键或两个 a 键位置形成，而是在一个 a 键和一个 e 键位置形成。（4）具较正电性的配体倾向于占据 e 键而具较负电性的配体倾向于占据 a 键位置。（5）配体可通过假旋过程交换位置。

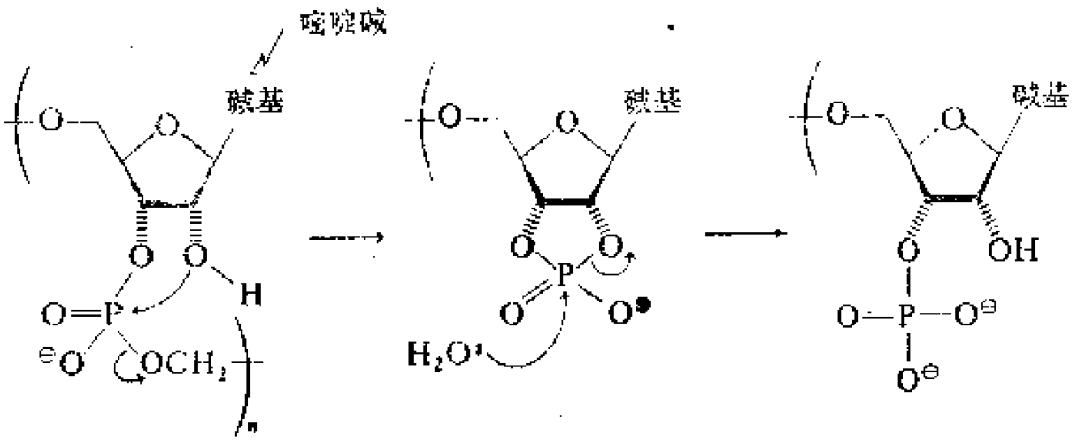
在前述五元环磷酸酯的水解中间体中，其五元环几何上最有利的位置应是跨跃 a 键和 e 键之间，O—P—O 键角为 90°，然而实际上由于五元环的角变形，产生一定的环张力。不难想象，该五元环若占据的几何位置是跨跃两个 a 键或两个 e 键将会特别不稳定。因此，环状的甲基亚乙基磷酸三酯的水解中间体经过假旋，甲氧基便能够从 a 键离去：



奇怪的是环磷酸酯类的水解唯一遵循开环历程。这可以用优先规则加以解释：较正电性的配体占据平伏位（靠近磷），因此环磷酸酯中与磷相连的碳原子总是占据平伏位，而较负电性的氧原子总是占据顶生位。磷原子本身电负性相当大，因此倾向于远离其它电负性大的原子，这是不难理解的。环磷酸酯水解时，五配位中间体一旦形成，它就不能经受假旋，因为那将会使环上碳和氧原子交换位置，这是规律不允许的。因此，与前述甲基亚乙基环磷酸三酯不同，由于环磷酸酯假旋禁阻，唯一可能是占据 a 键的环上O离去，故其酸催化水解唯一得到开环产物。



与体外磷酸酯水解相比，体内的水解有更强的专一性，如核糖核酸酶A（RNase A）是一种含124个氨基酸残基的多肽链，可催化经两步机理的 RNA 降解：酯交换和随后的五元环中间体的水解。RNaseA 不是切断 RNA 的每个磷酸酯键，该酶进攻



RNA链上的位置选择部位与糖环上存在的碱基和酶的来源有关，从牛胰腺得到的RNase进攻在3′连接磷酸酯的核苷上含有嘧啶环的磷酸酯键，而从*B. subtilis* 菌得到的RNase则进攻在3′连接磷酸酯的核苷上含有嘌呤碱时的磷酸酯键。

根据假旋的认识，对于酶催化的 RAN 磷酸二酯键的水解所经历的酯交换及水解每一步都可能有两种立体化学机理[10]。根据置换过程中进入基团和离去基团的相对几何状态，参照三个e键配体构成的平面，如果进入的基团（亲核试剂）从此平面的一侧进入而离去基团从另一侧离去，也可以看作是背面进攻的直接

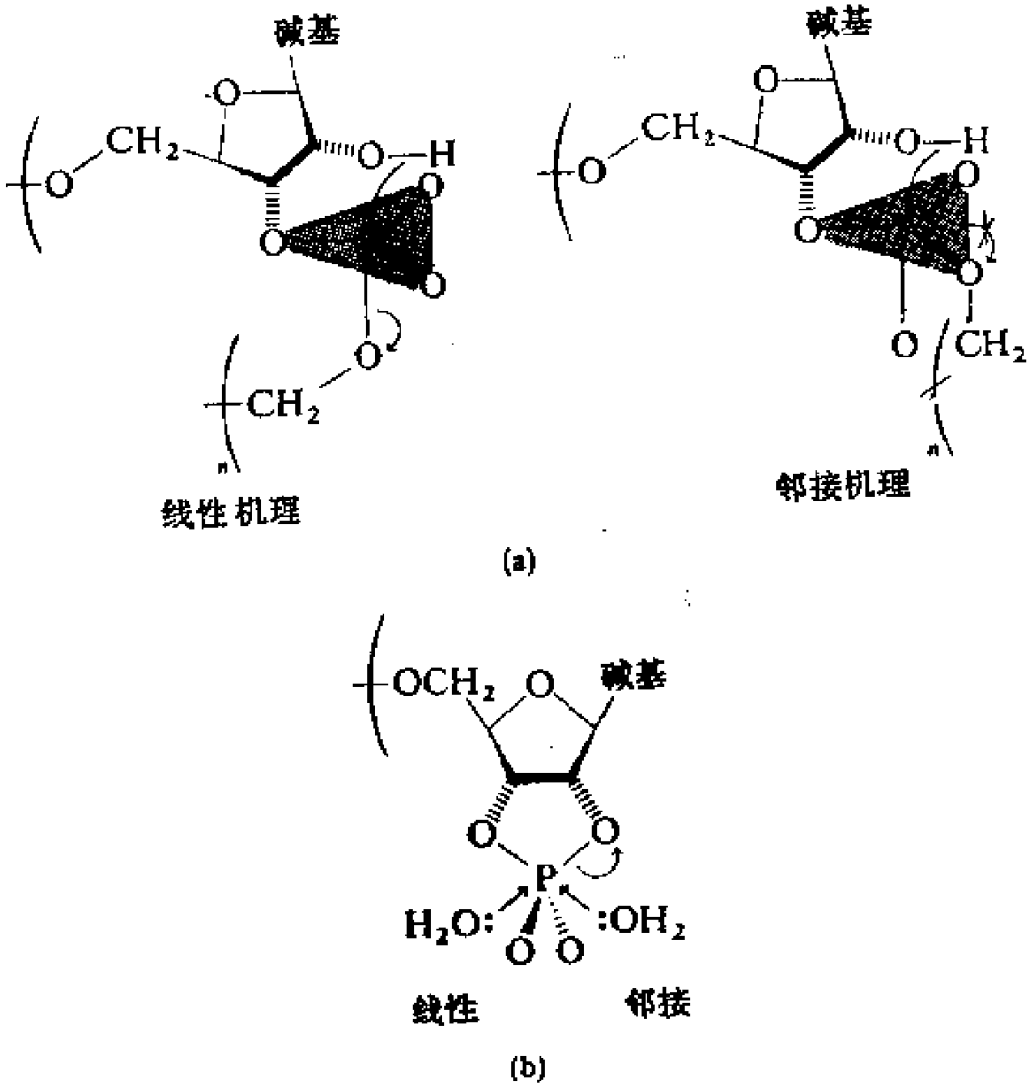


图 3-4 RNA 磷酸二酯键水解的两种机理的区别

置换的情况，就称为线性（in-line）机理；另一种情况是，如果进入的基团从上述平面的一侧进入，而离去基团仍是位于此平面内，因此此离去基团必须经假旋，从e键位置转成a键位置后才能离去，此情况称为邻接（adjacent）机理（见图 3-4）。

图 3-5 表示 RNase 水解 RNA 机理：经酯交换和水解两个步骤。许多研究指出，至少有三个氨基酸残基参与 RNase 的活性部位：两个组氨酸，一个赖氨酸。应注意到，在生理pH下，两个咪唑环仅其中一个质子化而另一个不质子化。咪唑环起到广义的酸碱催化剂的作用，而正离子的赖氨酸可能有助于五配位中间体的稳定化。很明显，磷酸酯部分与酶的初期结合并不涉及赖氨酸残基[9]，而是通过在磷酰基上的氧和一个酰胺键上的氢之间以及和一个谷氨酰胺残基之间形成两个氢键而结合。这些氢键也会增加磷原子的亲电性。另一个重要的氢键在质子化的咪唑环和底物中将要与磷原子分裂开的氧原子之间产生。该氢键除连接功能外还会在底物水解过程中使电子密度朝着质子从咪唑环完全转移的方向发生极化。

分子内的酯交换一步（图3-5），是由酶活性中心上的 His-12中未质子化的咪唑环首先夺取底物中2′羟基的质子（广义碱催化）形成2′羟基的烷氧负离子，此离子作为较强的亲核试剂进攻相邻3′位的磷酰键（从a键方向），形成三角双锥体的环状五配位中间体，然后作为多聚链一部分的 $-OR^5$，经咪唑环的质子化（广义酸催化）后从中间体离去，至此酯交换完成，RNA 分子断裂成两段；其中一段形成 2′，3′-环磷酸酯。在以上过程中若按线性机理进行，离去基是位于中间体三个e键平面之下的a键，那么必须要有另外一个咪唑环（His-119）对其质子化，因为夺取底物2′羟基质子的 His-12 咪唑环不可能再伸到下面去质子化离去基团，因此线性机理需两个组氨酸参与酶的活性部位。另一方面，如果离去基是在e键，即将断裂的磷-氧键就会很接近 His-12 的咪唑环，因而会被夺取2′羟基质子的同一个咪唑环

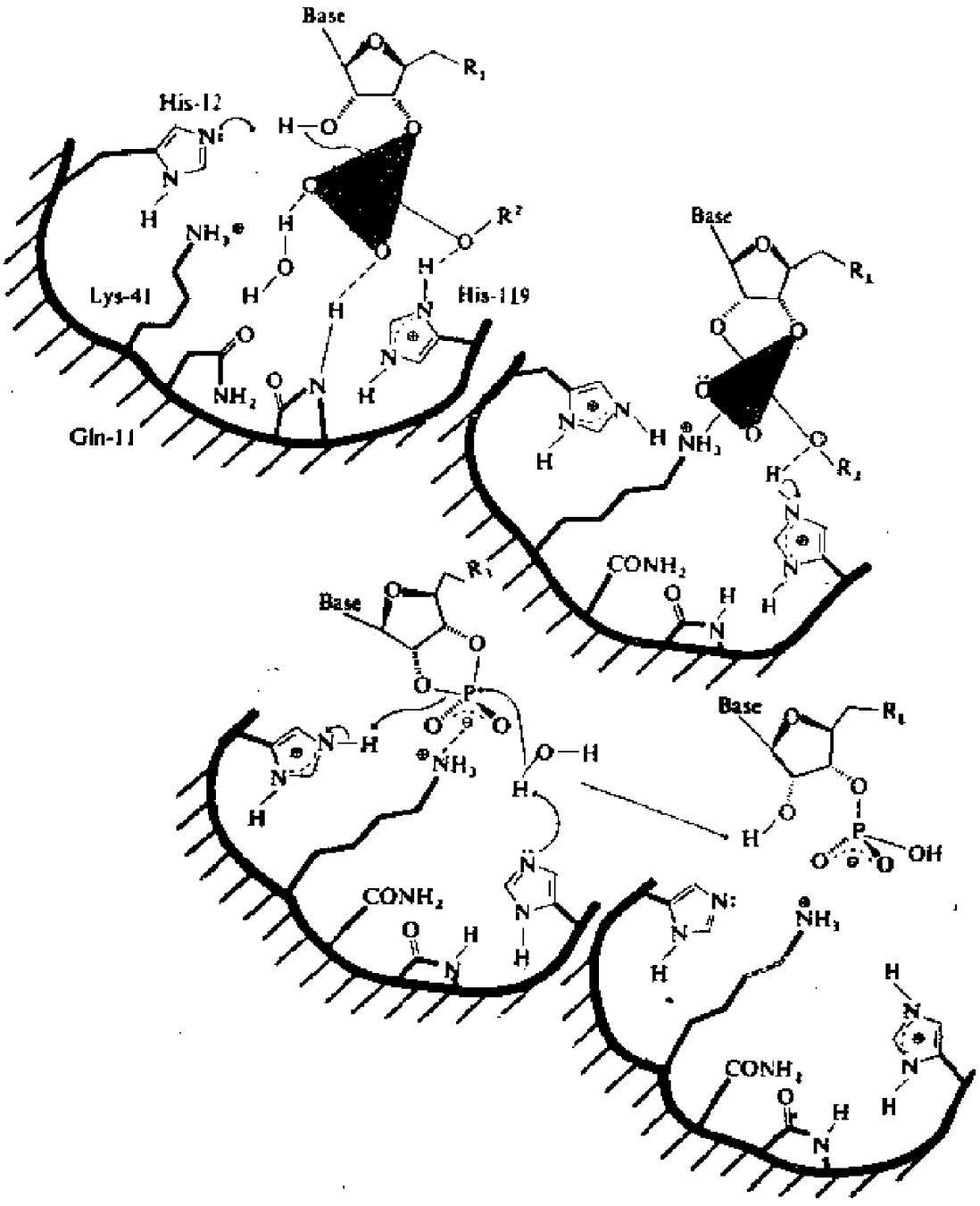


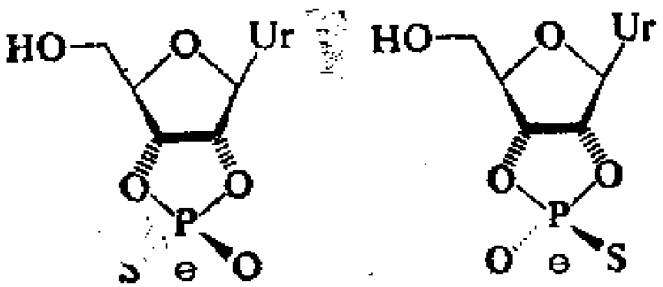
图 3-5　核糖核酸酶催化 RNA 水解机理

氨基酸残基数码指在多肽链上从N-末端氨基酸算起的位置．R_1和R_2代表同一大分子RNA上的聚核苷酸链

(His-12) 质子化，这种邻接机理需多一步假旋，并且只要一个组氨酸参与催化即可。

2′，3′-环磷酸酯的水解经历大体相同的途径（图3-4），同样，咪唑环起到广义碱的催化功能，从水中夺取质子，并且取决于线性机理或邻接机理，第二个或同一个咪唑环使离去基质子化。水解完成后，活性部位再生，最初的未质子化的和质子化的咪唑环再度形成。

通过一系列严密的实验已证实 RNase 的催化水解两个步骤均经线性机理[10，11]。问题解决的关键是尿嘧啶 2′，3′-硫代环磷酸酯的非对映体分离。将两种异构体均用 RNase A 催化，



异构体A　　异构体B

用$H_2{}^{18}O$水解。异构体A水解机理解释如图3-6所示，若按照线性机理，应构型转化，若按照邻接机理则构型保持。第二步的化学闭环反应，使用氯化磷酰二乙酯在吡啶中进行，该反应是已知伴随构型转化的过程。第一步酶反应的立体化学可通过两步反应后产物中分离出差向异构体的硫代环磷酸酯并测定产物中^{18}O含量来加以确定。正如所料，作用物异构体A经 RNase-催化水解，然后重新关环（构型保持），^{18}O只存在于产物中的异构体B中，不存在于A中，因此证明水解一步经线性机理而不是经邻接机理。

上述核苷硫代环磷酸酯对于水解比其相应的环磷酸酯通常有较高的稳定性[12]。这对于许多以磷为中心的生物过程和酶的反

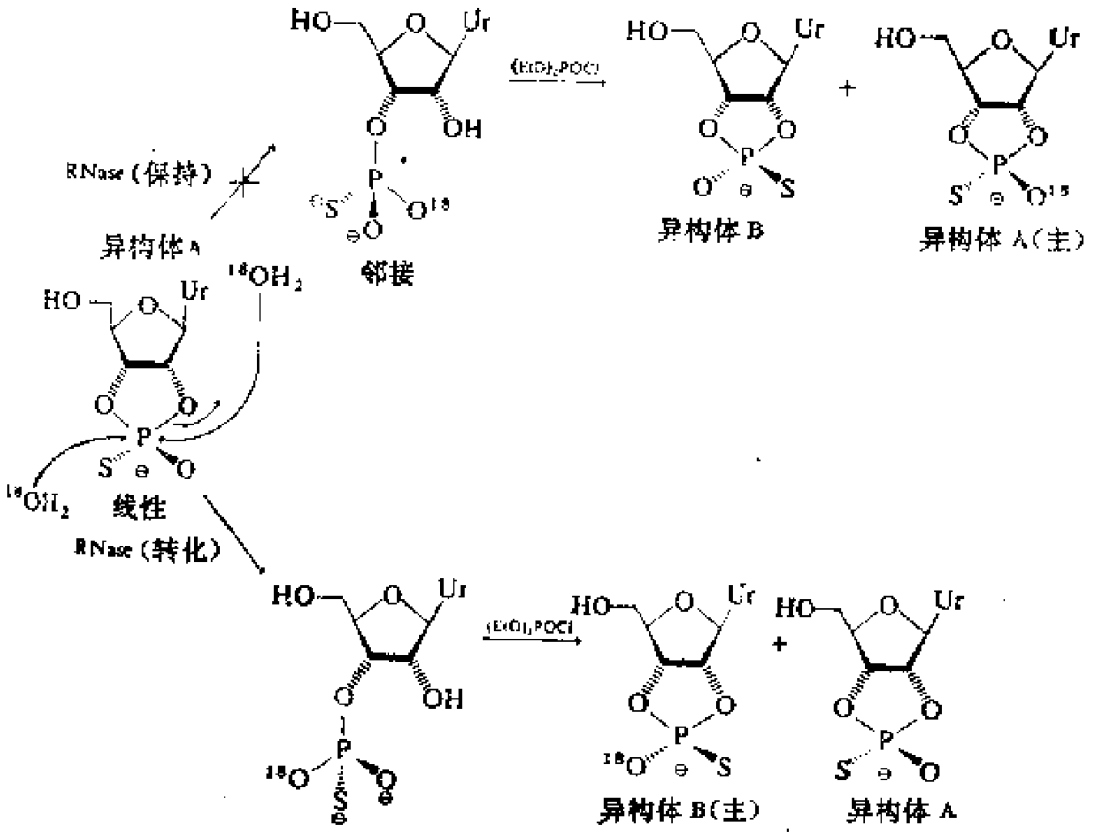
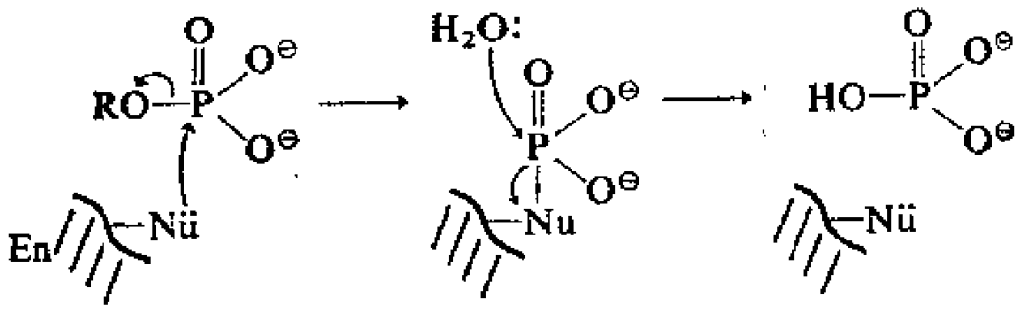


图 3-6 RNase 催化水解步骤机理的证明

应研究方面是很有用的[13]。

催化磷酸酯水解的许多其它酶包括环嘌呤磷酸二酯酶（目前关于它的活性部位的化学知之很少）和磷酸酯酶。磷酸酯酶可分为酸性和碱性磷酸酯酶，它们水解磷酸酯的最适 pH 分别为5.0和 8.5，它们的名称与此有关。它们均可催化磷酸单酯水解为相



应的醇和磷酸，水解过程均形成酶-底物共价中间体(见上页)。在酸性磷酸酯酶的情况下，亲核试剂是一个咪唑环，形成中间体咪唑的氨基膦酸盐（phosphoramidate）；而在碱性磷酸酯酶的情况下，亲核试剂是丝氨酸。已知碱性磷酸酯酶含有一个锌原子，该锌原子可能对磷酰基起结合部位和路易斯酸的作用。当我们回想起在碱性 pH 下磷酸单酯的水解是多么困难时，便可理解上述酶的作用了。

3.4 生物合成磷酸二酯键的化学及抑制药物

DNA 和 RNA 的生物合成是个复杂过程，例如大约需20个酶参与DNA的合成，其中包括亲代 DNA 的双螺旋股的分离，加入和除去小的引物（primer），剪去不正确的核苷酸，修复损伤区域等，这些内容可参阅“生物化学”教科书的有关部分。这里就在单股DNA模板作用下由引物开始，根据Watson-Crick碱基互补原理进行 3′，5′-磷酸二酯键合成中的化学特点进行说明。

引物链上的3′-OH向底物三磷酸酯（dATP, dGPT, dCTP或 dTTP)的α-磷进行亲核性进攻时，焦磷酸根（PPi）作为离去基团离去（图 3-7）。因为该磷酸酯键的形成是需要作功的过程，离去基团越容易离去，反应就越容易进行，焦磷酸根是比氢氧根和磷酸根更弱的碱，因此是良好的离去基团；同时，焦磷酸根的水解可释放能量促进聚合反应的进行。因此，在 DNA 的生物合成中，参与合成的单核苷酸是以三磷酸酯的形式而不是单磷酸酯或二磷酸酯的形式参入合成。反应表示如下：

$$\text{引物DNA} + n\ (\text{dATP},\ \text{dGTP},\ \text{dCTP},\ \text{dTTP}) \xrightarrow[Mg^{2+},\ -n\ PPi]{\text{DNA 聚合酶}} \text{引物DNA-[(dAMP)-(dGMP)-(dCMP)-(dTMP)]}$$

或：

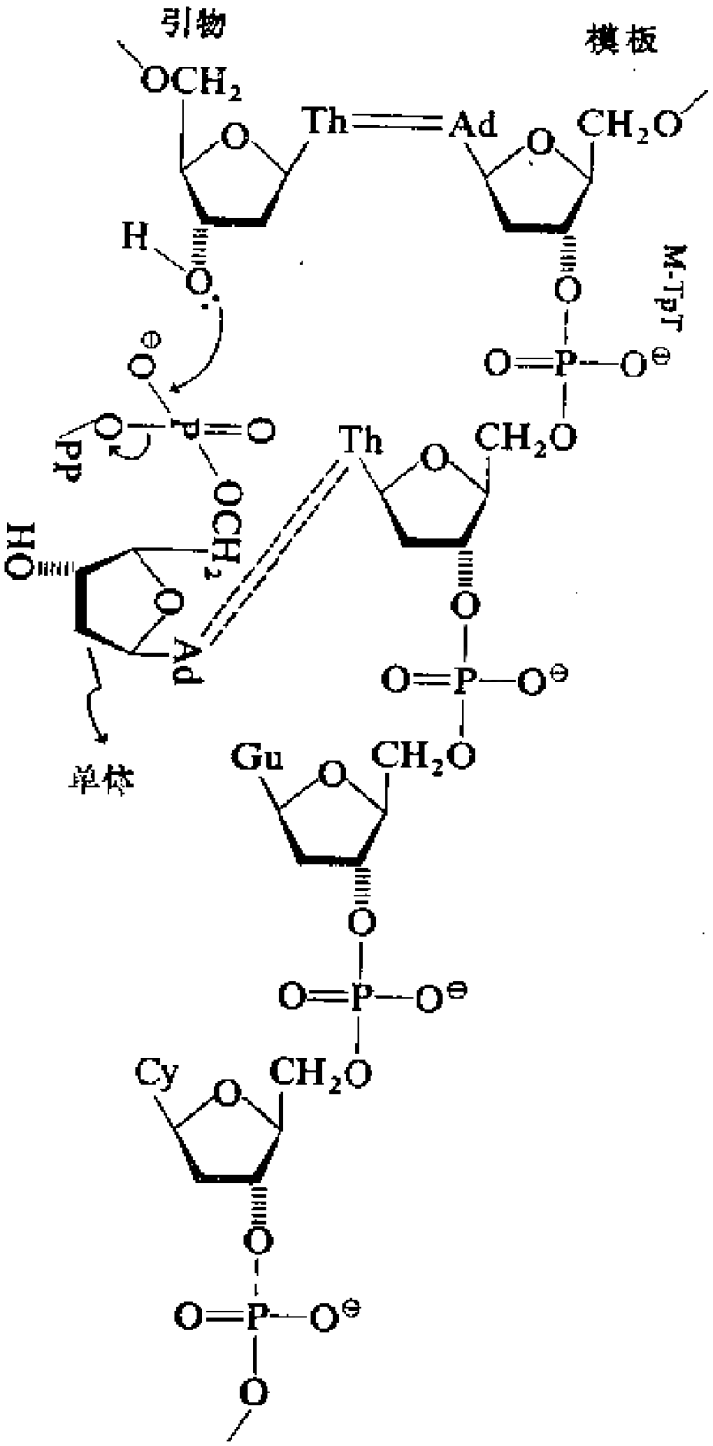


图 3-7　DNA 的生物合成

引物链上 3′-OH 向底物三磷酸酯的α磷进行亲核性进攻

RNA生物合成中，3′，5′-磷酸二酯键的合成类似 DNA 的合成：

$$\text{DNA 模板} + n(\text{ATP, GPT, CPT, UTP})$$

$$\xrightarrow[\text{RNA聚合酶}]{Mg^{++}} -n\,PPi$$

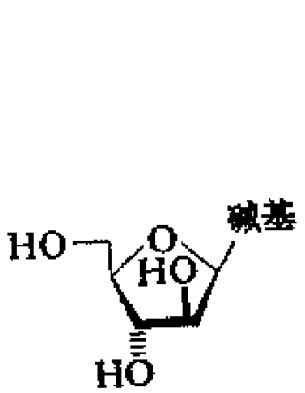
$$\text{DNA模板-}[(AMP)-(GMP)(CMP)(UMP)]_n$$

这样，在所谓的转录过程中，来自 DNA 的基团信息就转移到 RNA 上形成所谓的信息 RNA（mRNA）。新链合成时不需要 RNA 引物，只需具有复杂亚单位结构的 RNA 聚合酶结合到单股 DNA 的特定区域，并从此点作起动区（promoter region）进行 RNA 的合成。

能够抑制 DNA 合成的药物对于癌的化学治疗是非常重要的，虽然它们在抑制癌细胞的 DNA 合成同时也影响正常细胞是人们所不希望的。这些药物的价值基于这一事实：许多癌症（例如白血病）癌细胞的增生速率大大超过正常细胞的增长。这样的药物分为核苷和非核苷的类似物两类。

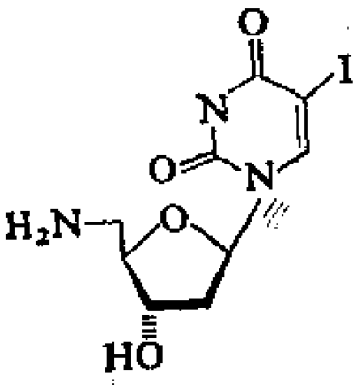
最好的已知核苷类似物也许是阿拉伯糖衍生物如阿糖胞苷 Ara(C) 和阿糖腺苷 Ara(A)。二者在体内均经三磷酸化转成 Ara(CTP) 和 Ara(ATP)，由此它们对DNA行使双重作用：抑制DNA聚合酶〔例如Ara(CTP) 抑制 DNA 聚合酶Ⅱ和Ⅲ〕及可以掺入到 DNA 合成中去〔Ara(CTP) 同样可掺入到RNA中去〕。这种掺入对 DNA 的影响是很要害的，因为仅仅微小的结构差别将会影响到 DNA 的几何形状，从而影响 DNA 的稳定性，例如由于 2′-羟基的立体障碍使胞嘧啶碱基与糖之间采取了一种新的苷键角度。

一种高度专一性药物：5-碘-5′-氨基-2′，5′-二脱氧尿苷（IAdU）能抑制单纯性疱疹病毒（Ⅰ型）DNA 复制而不影响哺乳动物的 DNA 复制过程。IAdU的选择性作用机理基于三磷酸底物合成的水平：只有被病毒感染的细胞才有可能将 IAdU 的



Base=cytosine(C)

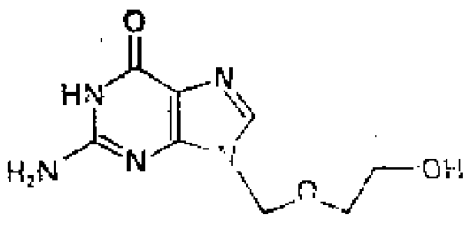
Base=adenine(A)



5-碘-5′-氨基-2′, 5′-二去氧尿苷 (IAdU)

氨基三磷酸化生成IAdUTP，然后参与病毒 DNA 的合成。这种 DNA 由于含有稳定性差的磷酰胺键，最终可能干扰复制过程，例如可能降低磷酸二酯骨架的稳定性。不幸的是这种专一性未扩展到致癌病毒上去。

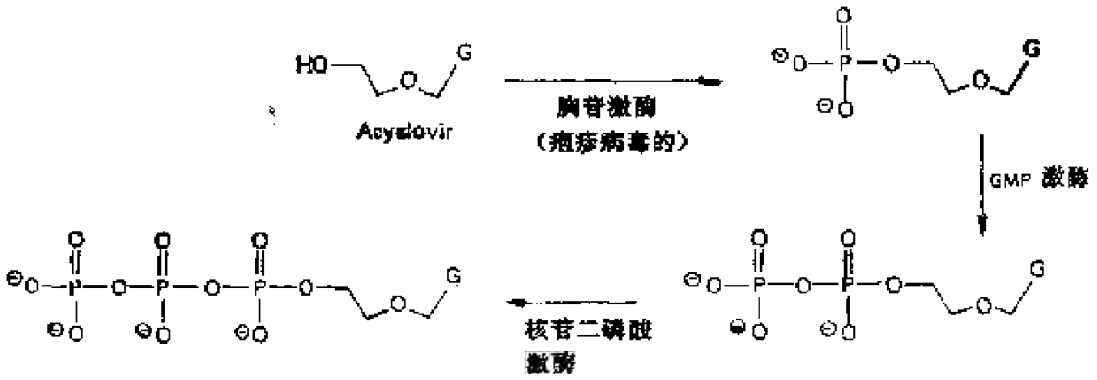
Acylocvir 是鸟嘌呤核苷失去糖环的C′-2′和C-3′值的类似物，它可在相当于原核苷的5′-羟基的位置被病毒的胸苷激酶专一性地磷酸化。在正常的无感染的细胞中没有这种代谢发生。在病毒感染的细胞中，磷酸化的 Acyclovir 可被宿主细胞的鸟苷酸激酶识别使其成为二磷酸酯，然后再被核苷二磷酸激酶作用生成5′-三磷酸酯，此化合物是疱疹病毒 DNA 聚合酶的底物，因而掺入病毒 DNA 的合成，但由于生成的新链中没有3′-羟基（这是 DNA 生物合成中新链增长的链端），因此停止了病毒 DNA 的合成。



Acyclovir

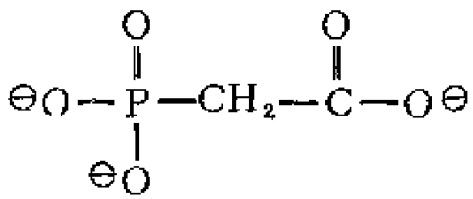
Acyclovir 的类似物 6-去氧 -acyclovir 也是有效的药物，它

可以被考虑是acyclovir的前体药物，在体内可被黄嘌呤氧化酶

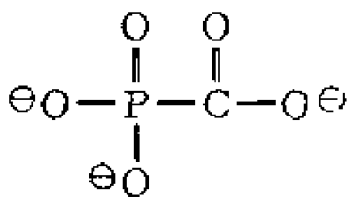


氧化成 acyclovir，它的水溶度比较大，因而可以使 acyclovir 的血浆水平较高。

磷酰乙酸（PAA）是在 1973 年经体外筛选得到的具有抗疱疹病毒作用的药物，两年之后发现其为病毒编码的 DNA 聚合酶的选择性抑制剂。后来又发现有关的磷酰甲酸（PFA）具有更强的抑制此酶的作用。PFA还可用于广泛的 HIV 逆转酶的体外测定。PAA和PFA都是焦磷酸的类似物，焦磷酸是多聚酶的产物，因而可能PAA和 PFA 结合到酶的相应位置上，从而阻止了 DNA 复制。



PAA

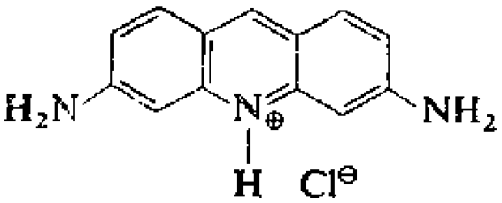


PFA

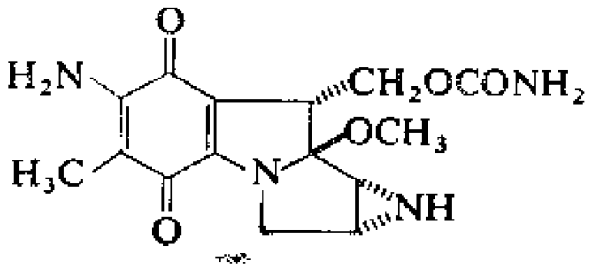
这些药物的问题是它们不需要事先活化，因而使用时完全要靠病毒编码的多聚物和宿主细胞的多聚酶之间的亲和力的不同，这也是此类化合物产生毒性的原因。

3.5 DNA 嵌入剂

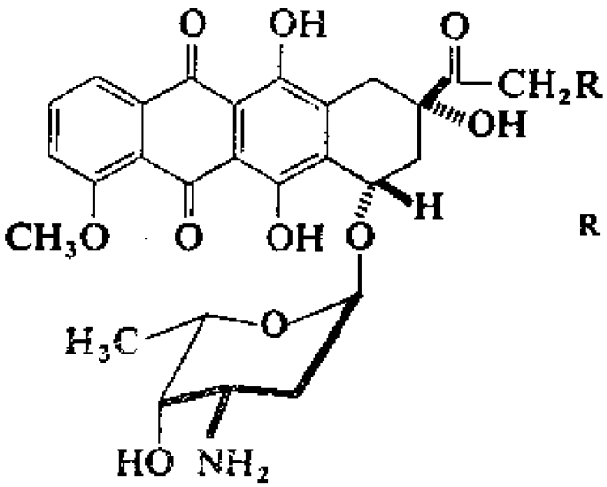
通过与DNA双螺旋相连接，抑制DNA合成的非核苷药物包括吖啶类，例如吖啶黄（proflavine），以及多种抗菌素，例如丝裂霉素C（mitomycin C），亚德里亚霉素（adriamycin）、柔毛霉素（daunomycin）。吖啶类与 DNA 和 RNA 的结合能力已用于作为对于这些分子的生物染色剂。这种结合是通过



吖啶黄



丝裂霉素 C

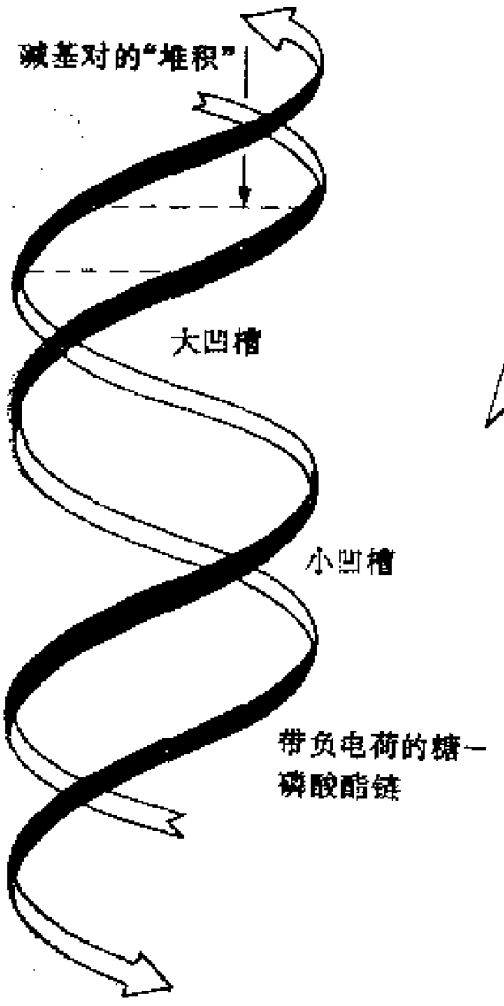


R = ●H. 亚德里亚霉素

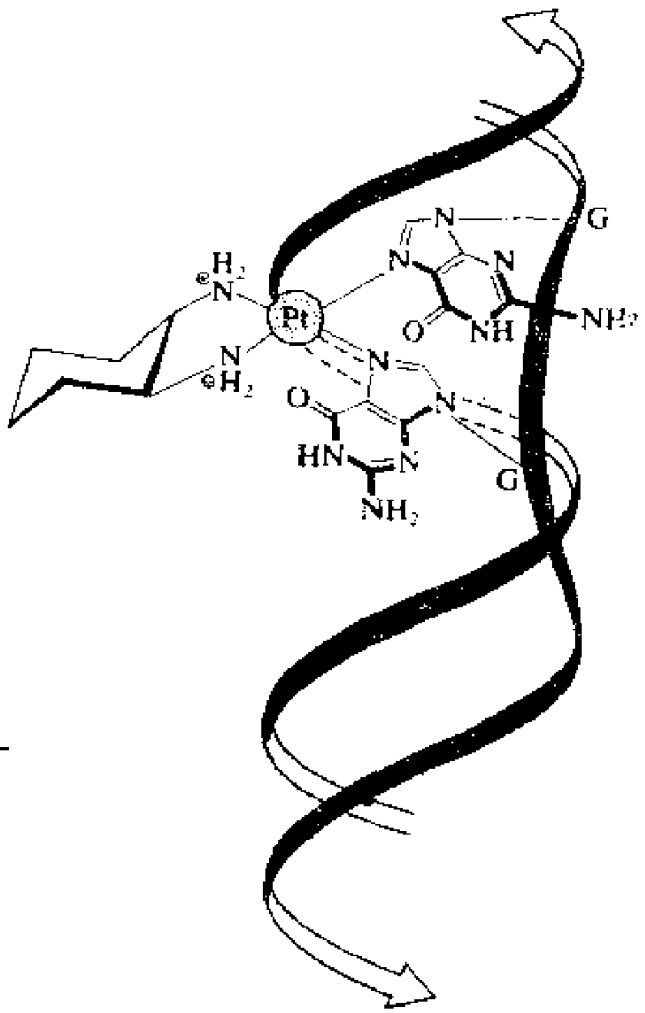
= H. 柔毛霉素

"嵌入"而完成；例如吖啶黄的平面结构嵌入双螺旋中堆积的碱基对之间。碱基堆集力是维持 DNA 双螺旋结构稳定的主要作用力，可以想象，选择一种含有结合分子的 DNA "夹心面包"会在几何状态上使双螺旋结构畸变（即变长）。已有报道观察到这种结构[14, 15]。一些抗菌素类也以相似的作用机理起作用，以上三例都有抗肿瘤性质。

1969年，Rosenberg 发现顺-二氯二氨合铂对许多种癌有极强的抗癌活性，而反式异构体无活性。铂离子连结到邻近的鸟嘌呤N-7位上，结果大大干扰了DNA双螺旋结构。顺-二氯铂-反-1,2-二氨基环已烷配合物是一个很好的例子（见下图）。在一些例子中，DNA 结构由于与试剂或药物特别是与嵌入剂结合而发生畸变，以致在结合区域，右手螺旋几乎变成左手螺旋。



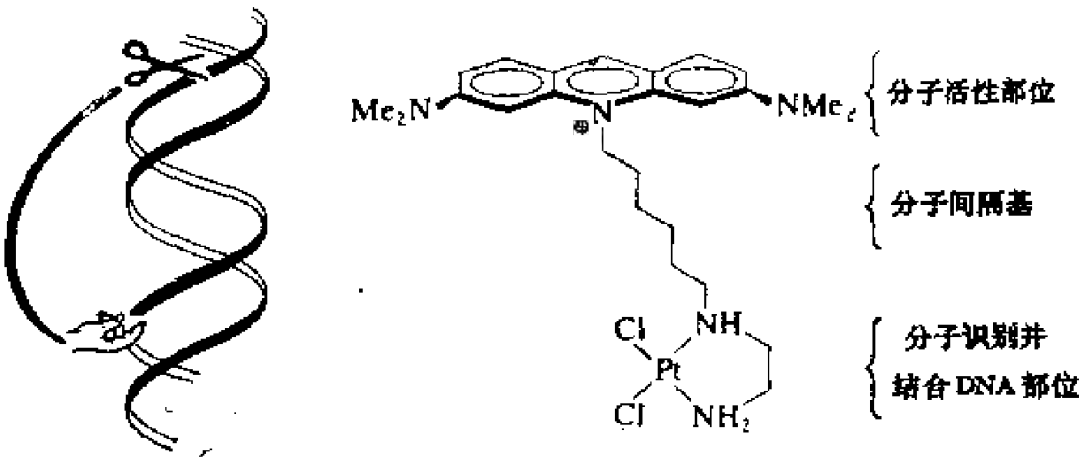
DNA 双螺旋示意图



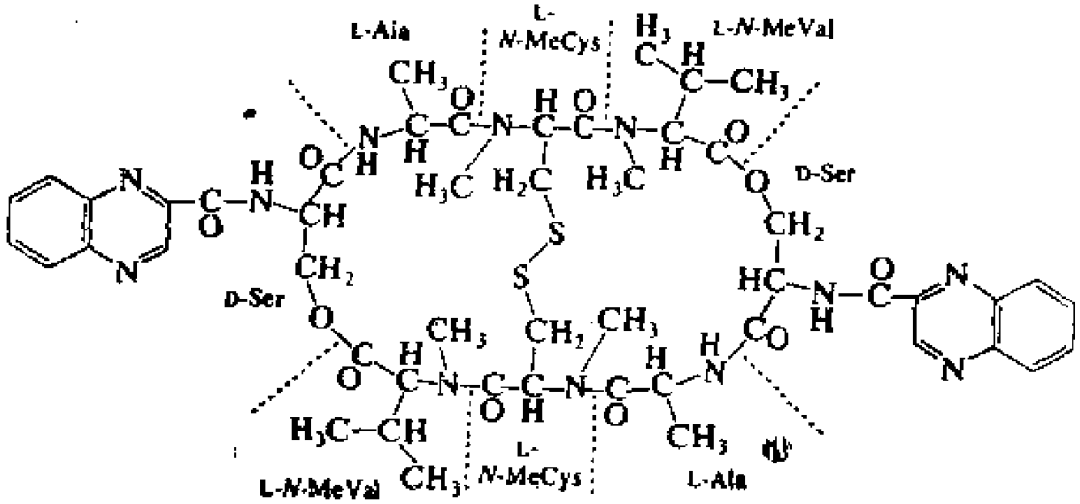
铂复合物使 DNA 明显形变

Lippard近来开发了一种抗肿瘤药物顺二氯二氨合铂(Ⅱ)的变种。该分子有一个起嵌入作用的吖啶橙基，通过多亚甲基链和

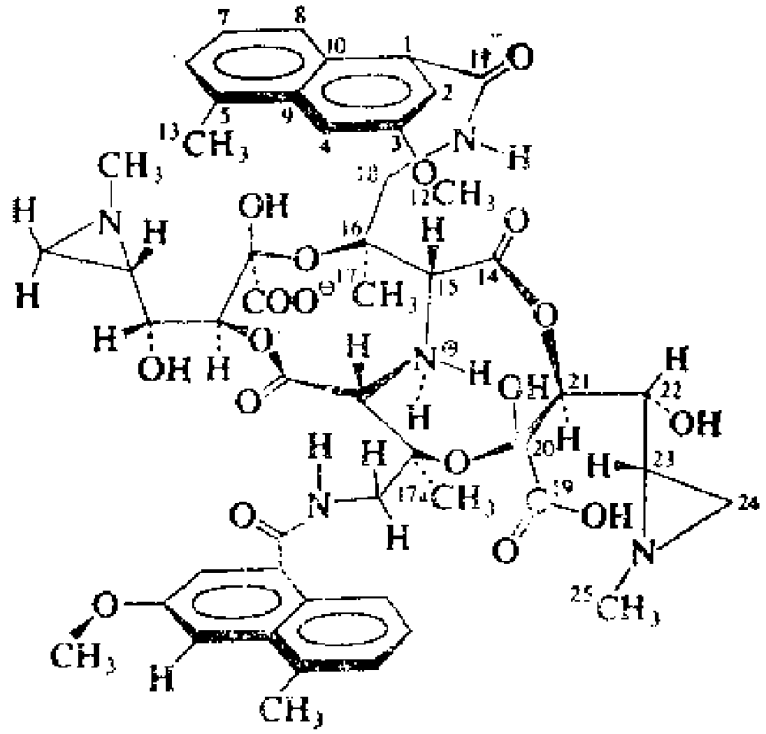
中心铂相连[16]。该新嵌入剂具有双重性能：分子的一端起识别并结合 DNA 的作用，同时，分子的另一端通过芳香环起嵌入作用。在光的存在下，这种嵌入剂能切断 DNA。下图艺术的简化了该嵌入剂的作用：吖啶橙基像一把“分子剪刀”，在存在光和 O_2 的条件下，切断并嵌入 DNA。



上述分子可称为双-嵌入剂。已知少数天然产物可作为双嵌入剂，其中以环肽三骨菌素A（triostin A）和大环抗菌素嗜癌素A（carzinophilin A）为代表[17, 18]。它们都具有相距10 Å



三骨菌素A

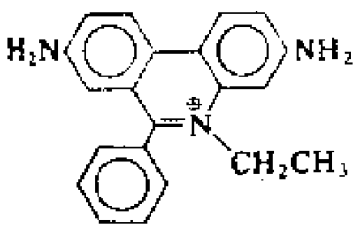


喷癌菌素A

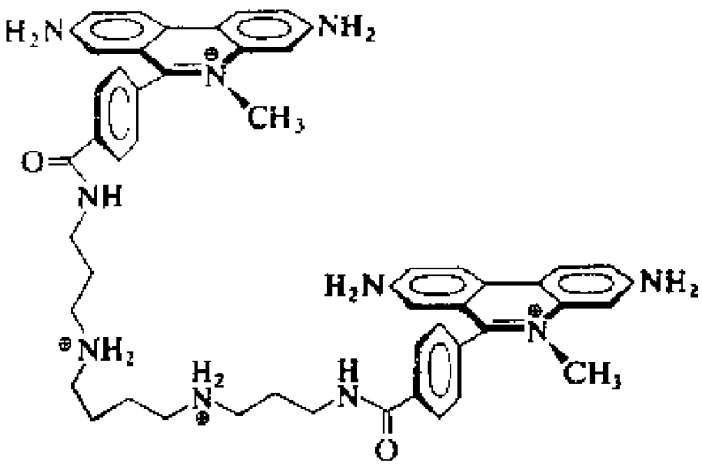
的两个芳香基，这两个芳香基可在相邻部位以顺（syn-）式与DNA 结合。

最近几年，合成了具有潜在的抗肿瘤活性的DNA双-嵌入剂和三-嵌入剂配体，特别是咔唑类似物[19]和二吖啶及三吖啶衍生物[20]。许多药物能够借助非共价相互作用专一性地与 DNA 结合[21，22]。

Dervan等开始了一项合成各种新双-嵌入剂分子的计划。制做的第一个化合物是一种已用作嵌入剂的溴乙锭类似物(ethidium bromide)，发展了相应的二聚体的制备方法，合成了双-（溴化3，8-二氨基-5-甲基-6-苯基菲啶鎓)-精胺(BMSp)[23]。这种嵌入剂有与四个碱基对结合的部位，并且比其单体与 DNA 结合能力至少强10^4倍。由于DNA是一种确切的大分子受体，因此有可能用合理的途径进行药物设计和提供对药物结合过程的位置专一性研究的极好机会。用小分子识别 DAN 分子，是化学治

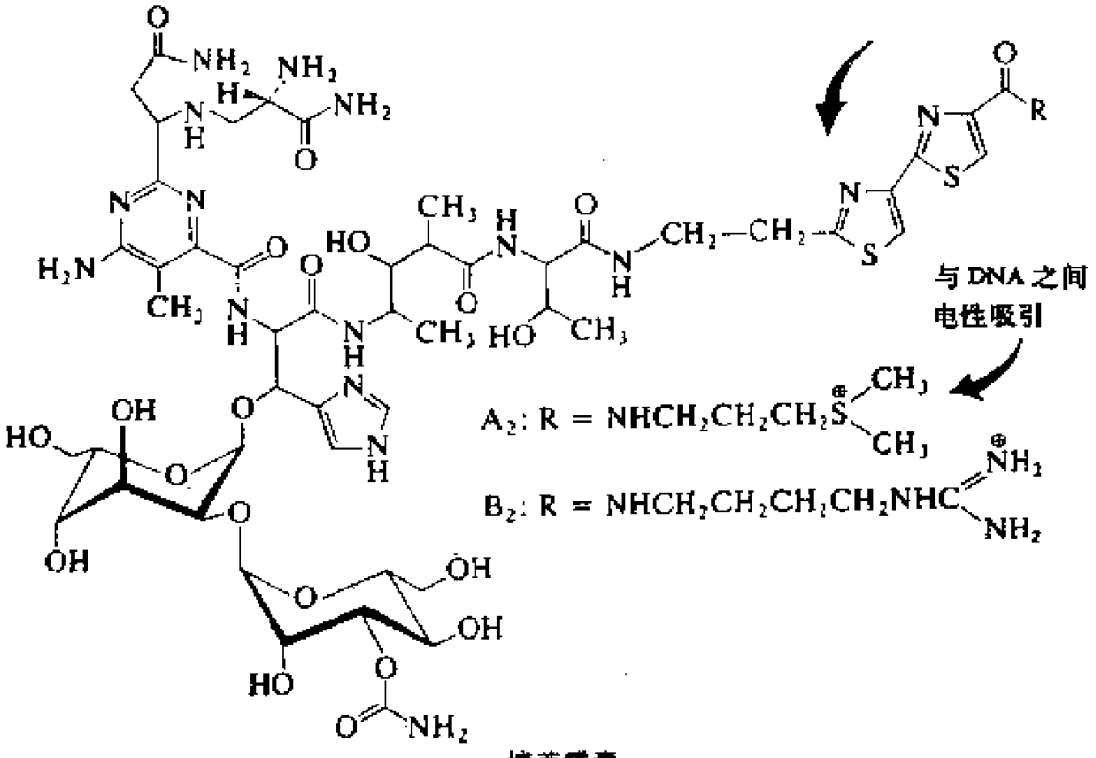


溴乙锭



BMSp

疗上的一个重要领域。



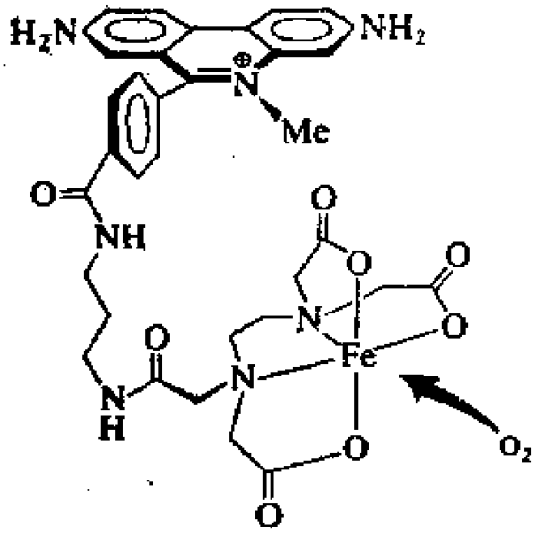
博来霉素

博莱霉素族（bleomycins）是临床上应用的金属糖肽类抗肿瘤抗菌素[25, 26]。据信其治疗效果是通过对 DNA 的嵌入并使 DNA 产生化学断裂的两种作用方式而完成。为此，所有博莱霉素族（简称 BLM）分子都由两个不同区域组成：一是嵌入DNA区域，其中双噻唑基团插入到 DNA 碱基对之间，侧链胍盐或锍盐部分所带的正电荷与 DNA 磷酸根的负电荷相互吸引；另一个是金属结合区域，是由咪唑和连有酰胺侧链的嘧啶环组成，侧链起离子配体的作用。这两个区域通过一个线型三肽连接在一起。博莱霉素与金属离子（通常是Fe^{++}）以及 O_2 形成一种活性配合物（$BLM-Fe^{++}-O_2$），这种活性配合物进攻 DNA 脱氧核糖的 C4′位产生 DNA C4′自由基，这种自由基再经与·OH或O_2的进一步化学反应，使 DNA 断裂降解。

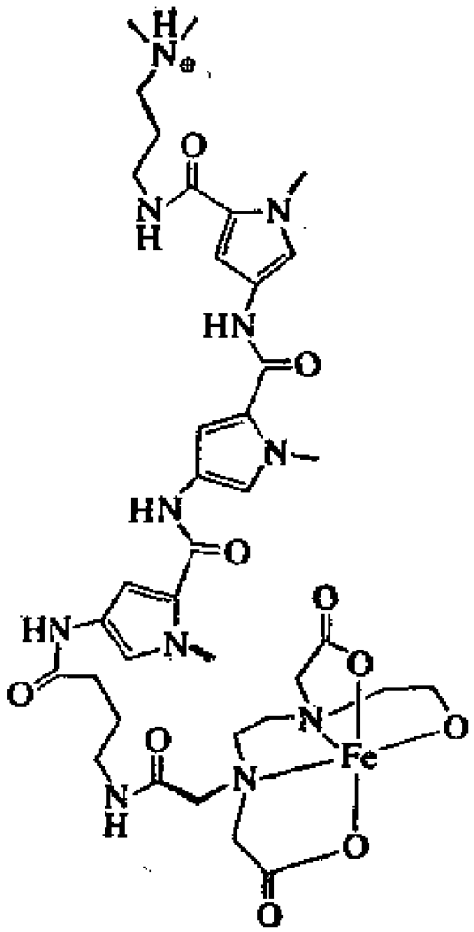
能否设计新的嵌入分子使其除了与 DNA 结合外也能模拟博莱霉素切断 DNA 的结构呢？出于这种大胆构想，Darvan 等获得了两个博莱霉素族的生物有机模拟物（methydium-propyl-EDTA）Fe(Ⅱ)〔简称MPE-Fe(Ⅱ)〕和(distamycin-EDTA)Fe(Ⅱ)〔简称 DE-Fe(Ⅱ)〕配合物[24, 26]。

以上两个化合物均在二硫苏糖醇（dithiothreitol）（简称 DTT）存在下切开了DNA双螺旋，具有博莱霉素-Fe(Ⅱ)/DTT 相类似的性能。与博莱霉素-Fe(Ⅱ)不同，MPE-Fe(Ⅱ)的切断不是序列专一性的。然而，如果将 EDTA-Fe(Ⅱ)结合到具有序列专一的 DNA 结合分子上时就能得到序列专一性的 DNA 切断分子。DE-Fe(Ⅱ)就是一例，其中天然抗菌素偏端霉素（distamycin）的三个甲基吡咯甲酰胺部分能连结在 DNA 双螺旋的小凹槽中[27]并以A＋T丰富的区域为高度选择性切断部位。

Dervan认为，将EDTA-Fe(Ⅱ)片段与序列专一的 DNA 结合分子（抗菌素类、多肽类、寡核苷酸类等）的结合手段将提供一种新类型的“DNA 亲合性切断分子”并可能是人工的限定核酸内切酶的设计和制造的基础，这些内切酶具有确定的靶序列和



(methidiumpropyl-EDTA) Fe(II)
MPE-Fe(II)

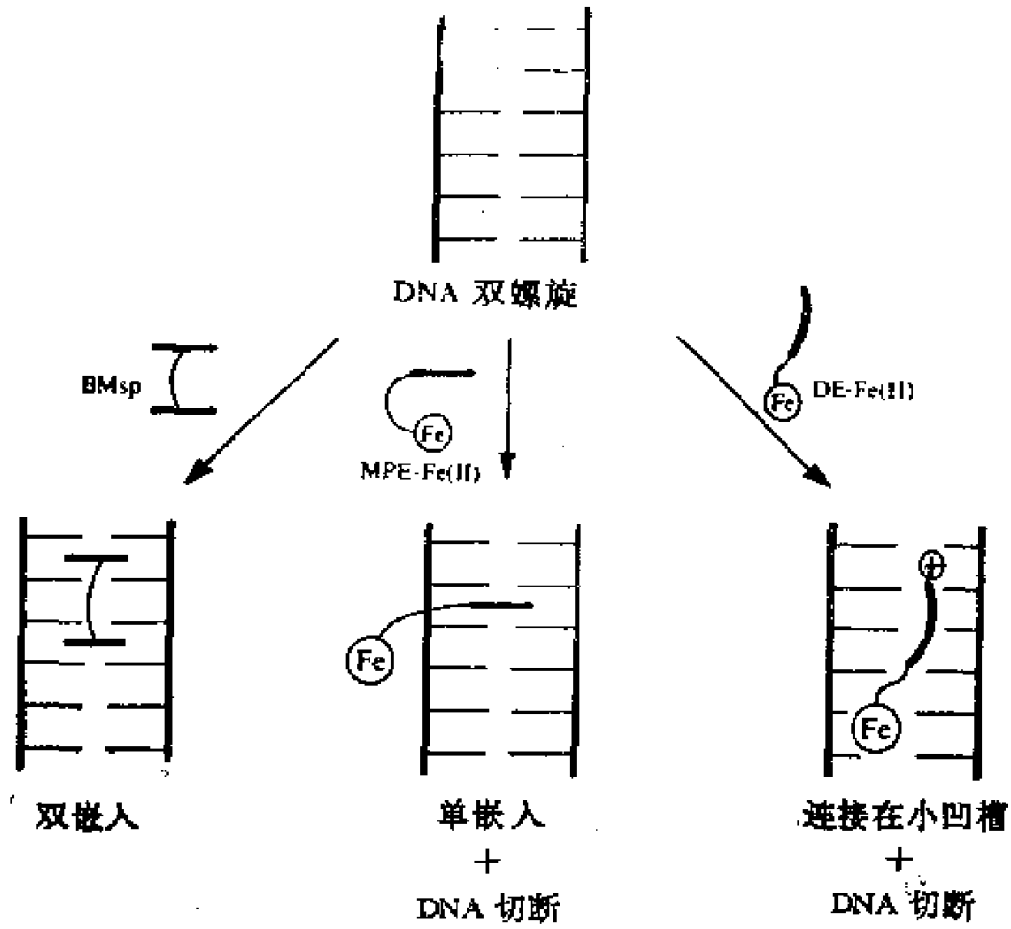


(distamycin-EDTA) Fe(II)
DE-Fe(II)

连接部位的大小。

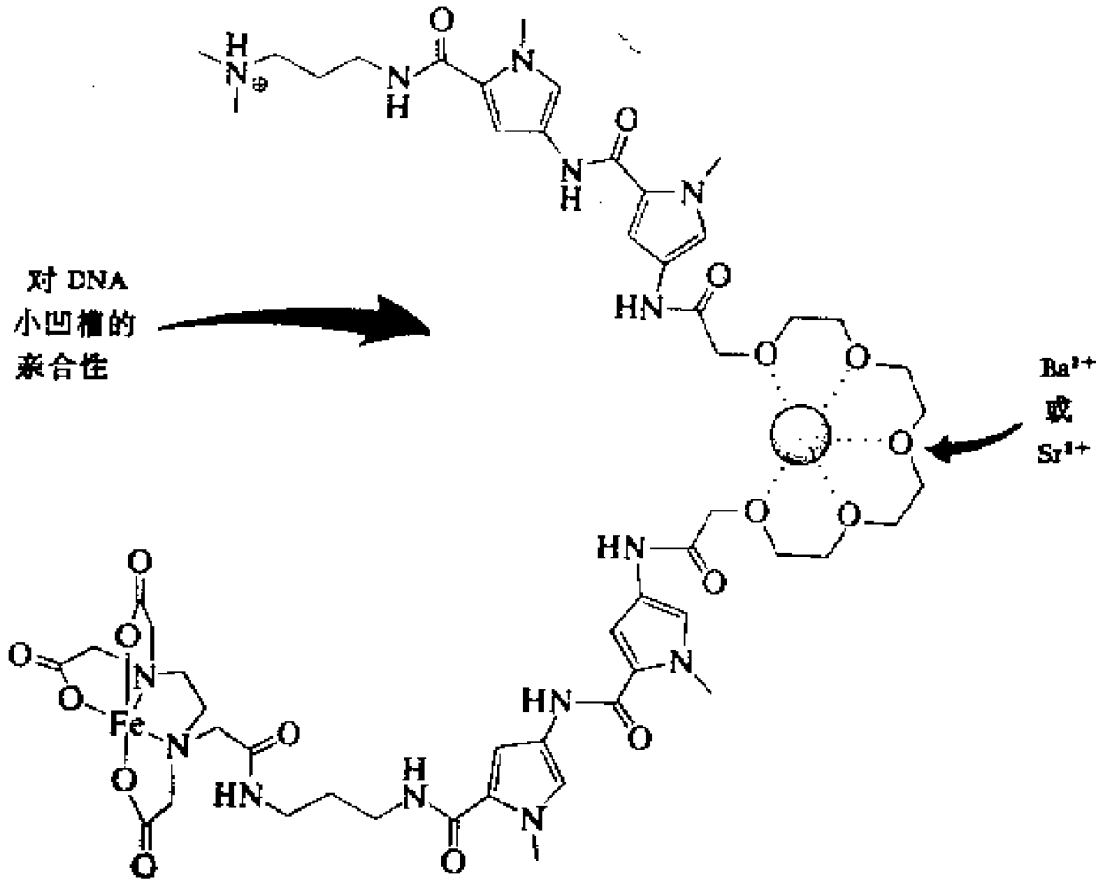
嵌入剂作用的三种类型可图解如下页所示。

Dervan 等也完成了一种混合式分子设计：双（纺锤菌素）-聚醚-EDTA-Fe(Ⅱ)。在Ba^{2+}或Sr^{2+}存在时，在 5′-TATAG-GTTAA-3′十个碱基序列分离处与 DNA 结合[28]。在这一特例中，这种月牙形分子由于存在结合到聚链上的离子而形成一个伪冠醚，有利于与 DNA 分子的结合。该工作说明了合成小分子对 DNA 双螺旋序列专一地结合的金属调节作用（见92页）。



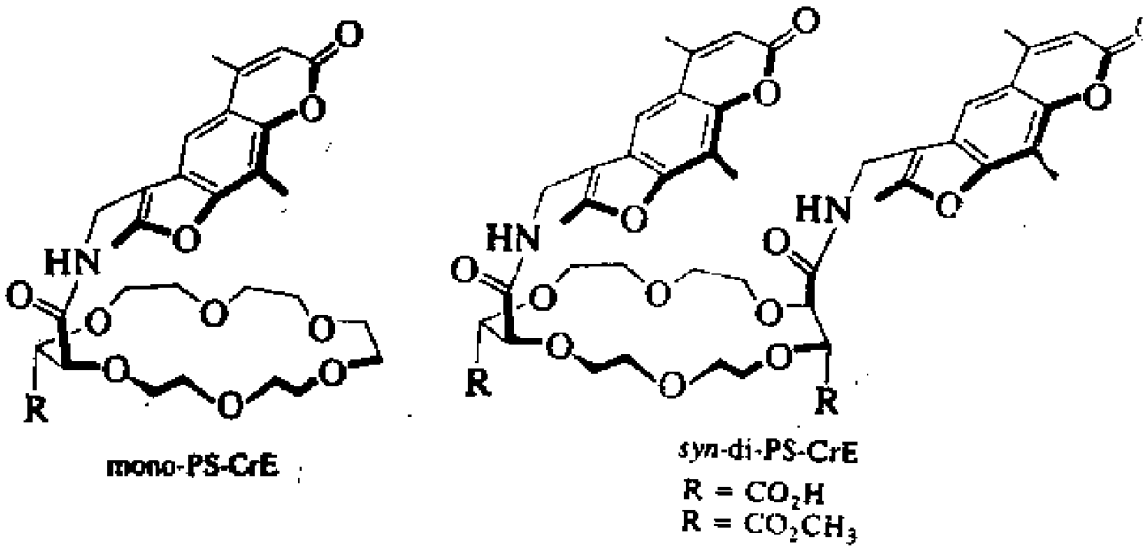
上例情况与博莱霉素相似与 DNA 结合分子连接的 EDTA-Fe(Ⅱ) 在可控制的氧化还原条件下产生了高活性、短寿命、能扩散的游离基HO·，其氧化断裂去氧核糖骨架，从而导致 DNA 双螺旋切断。

Cantor 等用相似手段合成了一些有趣的嵌入分子—能光致交联于 DNA 双螺旋的单-和双-补骨脂素 (Psoralen)[29]。在补骨脂素和 DNA、RNA 的嘧啶碱基（即dT和U）之间形成的光化学加成物已被广泛鉴定[30]。以稍有不同的设计合成了一系列补骨脂素 (PS) 以共价结合在冠醚 (CrE) 上的双-和单-嵌入分子类似物[31]。其优点是具有半刚性的冠醚骨架，使补骨脂基处于有利的立体取向。预期这样会显示出与 DNA 受体有更专一和更强的嵌入功能。生物测定的初步结果表明 mono-PS-

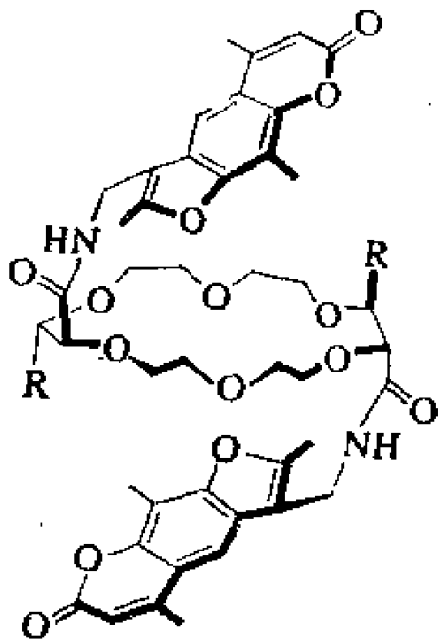


双（纺锤菌素）-聚醚-EDTA-Fe(Ⅱ)

[bis(netropsin)-polyether-EDTA-Fe(Ⅱ)]

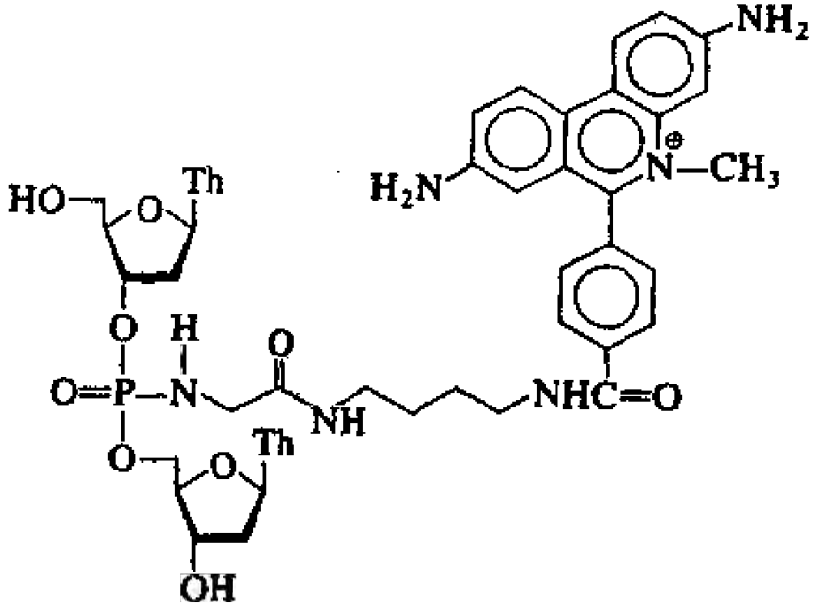


CrE和anti-di-PS-CrE有活性，意外的是 syn-di-PS-CrE 不与 DNA 连结，然而相应的二甲酯（$R=CO_2CH_3$）却对 DNA 有微弱的连结并可光致交联。为什么顺式化合物不嵌入到 DNA 中去？一个理由可能是两个补骨脂素环之间有利的堆积，这与其 UV 光谱中强的“减色效应”一致，因而不利于与 DNA 的结合。另一个理由是冠醚本身，特别是当 R=COOH 时冠醚的电负性，使该分子对主链结构为负离子的聚电解质的 DNA 亲和力降低。



anti-di-PS-CrE

原则上，带有两个连接部位的嵌合剂应比带有单个连接部位的嵌合剂与 DNA 能够形成更牢固的复合物。二核苷酸甲锑盐（M-TpT），可视为带有两个不同类型连接部位的寡核苷酸的典型代表，其中甲锑盐和嘧啶碱基两个部位能协同作用。Letsinger 认为，在结构上能促使其连接于



M-TpT

多核苷酸互补序列的化合物，就可能成为涉及多核苷酸酶过程中对活性位置专一的抑制剂或促进剂[32]。

碱基的氢键、疏水性和静电力对于核酸的识别是关键的性质。发展新的能识别和结合特定的核酸或核酸碱基对的生物模拟受体分子，这是现代生物有机化学的重要目的。

3.6 作为催化剂的RNA分子

Cech 和 Altman 在八十年代各自独立地发现了 RNA 具有催化作用，从而改变了生物催化剂的传统概念，为此，他们共同获得1989年诺贝尔奖[33, 34]。

1982年，T. Cech等首次提出RNA 可作为催化剂的证明。他们发现，原生动物四膜虫（*Tetrahymena thermophila*）含有一种RNA，其组成除了核蛋白体 RNA 外还有一个由413个核苷酸组成的插入序列（intervening sequence，缩写IVS）。成熟的核蛋白体 RNA 即从该前体生成。T. Cech等研究了细胞中刚从DNA转录成RNA后，RNA中的插入序列或称内含子(intron)如何从前体 RNA 分子中剪切下来形成功能完善的RNA？根据过去传统概念，此过程必须有蛋白质（酶）完成。但他们发现，核蛋白体 RNA 前体能靠自己完成剪接过程，该 RNA 分子因此作为一种自身催化剂，加速RNA本身参与的化学反应[35, 36]。Cech 等把这个新的类似酶的（enzymelike）RNA 定名为 ribosyme（本书译为核酸性酶）。

前体rRNA除去一个内含子，产生成熟的 rRNA 的过程是怎样的呢？Cech 指出，这一过程只要有鸟苷（或鸟苷酸）存在即可。第一步，鸟苷（酸）作为触发剂，其 3′- 羟基进攻 IVS RNA 5′-端的磷酸二酯键，进行磷酸酯交换，使整个前体rRNA 分子在外显子（exon）与内含子之间切成两段：带3′-羟基的5′端外显子（图3-6中粗线部分）和以鸟苷（酸）为5′端的内含子

连着3′端外显子。第二步是5′端外显子的3′羟基选择性进攻3′端外显子与内含子之间的磷酸酯键，发生酯交换反应，生成成熟的rRNA（两个外显子交接在一起）及IVSRNA线性分子。线性的IVS的3′末端—OH基可特异性地进攻第15和第16核苷酸之间的磷酸二酯键，从而释放出一个15聚体并生成一个丢失15个核苷酸的环状的IVS（称IVS-15），后者在pH9时可以在原环合处准确地使环打开成线性分子。然后，活性的3′末端可再次切下一个4聚体生成一个环状的IVS-19，后者同样可水解成线性分子。线性的IVS-19不再能催化分子内反应，但仍具有酶的性质，能催化其它RNA分子发生化学反应。

作为催化剂的RNA不像一般蛋白质酶，它可在自身分子上起作用。在一系列过程中，随着IVS的割去，两端外显子的结合形成rRNA不需要ATP或GTP等提供外源能量。因为此过程仅仅是磷酸二酯键的断开而非磷酸酯的形成。鸟苷酸分子仅作为一种引物，借助于有一个游离的2′羟基易于参加反应，其浓度相对于RNA浓度也是高的。有趣的是，四膜虫IVS产生的RNA产物有5′磷酸酯和3′羟基末端，该末端是有催化功能的RNA分子的特征。相反，RNase A的进攻或RNA的碱降解通常产生5′羟基和2′，3′-环磷酸酯末端。关于产生上述情况的机理Cedergren等[37]进行了解释，Cech等近来的工作支持了他们的看法[38]。

核酸性酶还能催化其它分子的反应。Altman等研究了t-RNA分子的剪接过程。他们注意到t-RNA前体在核酸酶P的作用下切下一段无意义的序列而形成成熟的t-RNA。现知核酸酶P虽含蛋白质和RNA，但它的催化作用是由RNA部分完成，而蛋白质本身并无催化作用[39]。

RAN具有酶功能的发现可能有助于说明导致生命起源的分子过程。长期以来一直假设只有蛋白质能够提供催化功能。而人们总是惊奇：假若没有为酶编码的基因，酶怎会出现？而若没有

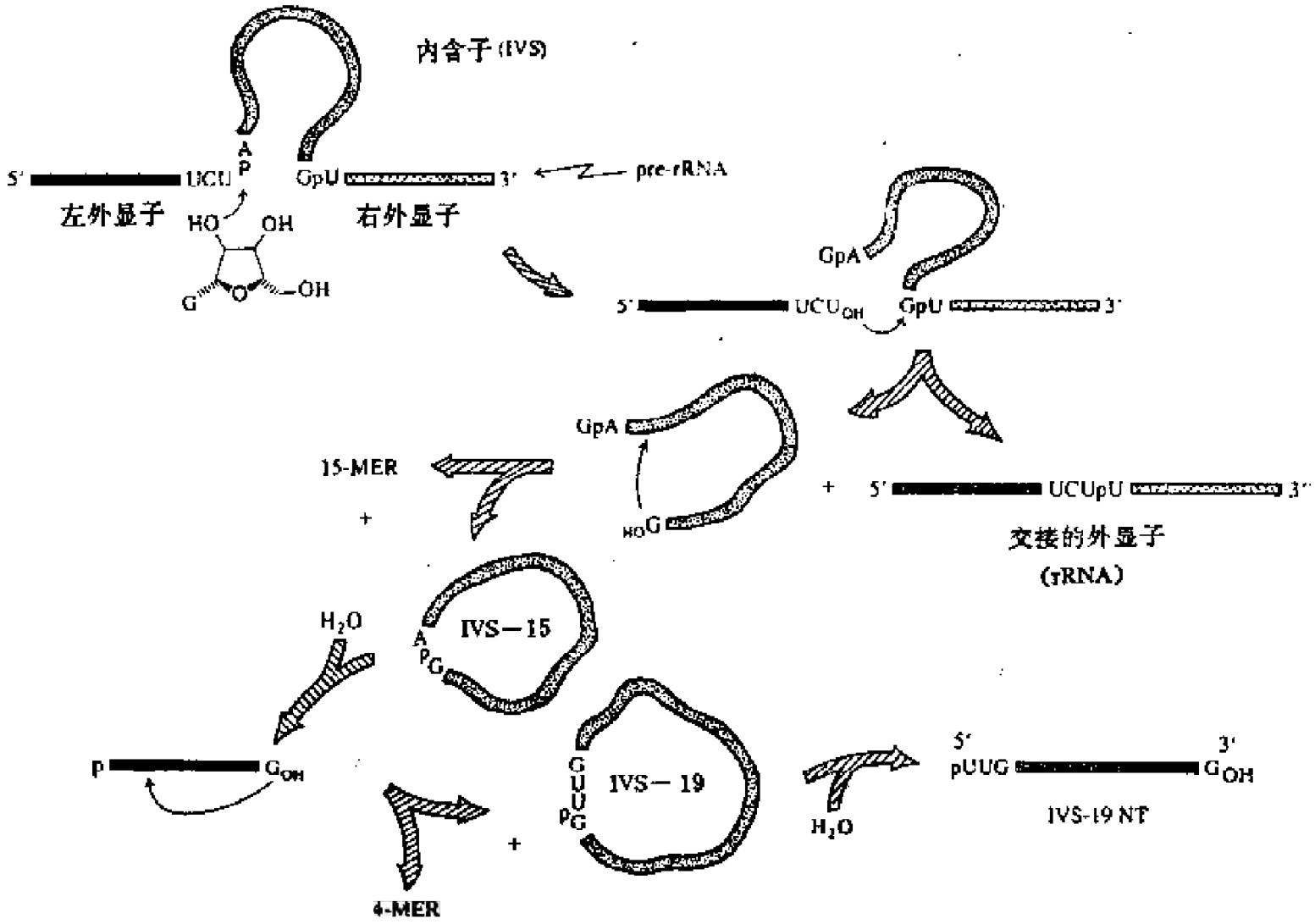


图 3-8　四膜虫自身断裂rRNA内含子的反应过程[88]

装配并复制基因的酶，基因怎会出现？正如“先有鸡?先有蛋?”这一无穷的问题。可以假设，第一个催化剂实际上是RAN分子而不是蛋白质，而RAN也做为原始时代的基因，此后由于从现在接受的蛋白质合成过程形成的酶变得更有效，因此，被RAN催化的重要性减小了。但是核酸性酶的发现给人们以启示，即RNA分子既是信息分子又是功能分子。这些新概念无疑对生物前化学的研究开辟新的思路。

崔季巧

第4章 酶化学

对反应具有高度专一性和高效性是酶反应的特点。酶催化反应所涉及的因素是本章讨论的主要问题。我们将以水解酶为例来论述酶催化反应的机理，其中包括四面体中间体及立体电性控制方面的概念。此外，将对“抗体酶”的概念作一简介。在本章的第一部分首先需要介绍催化的一般概念，这个概念是以过渡态为依据。

4.1 催化作用

按照过渡态理论，催化剂的作用是通过新的反应途径降低了过渡态的能量，从而降低 $\Delta G^{\ddagger}$ 值而加速反应。图4-1是以放热反应为例，说明催化和无催化过程的能量差异。

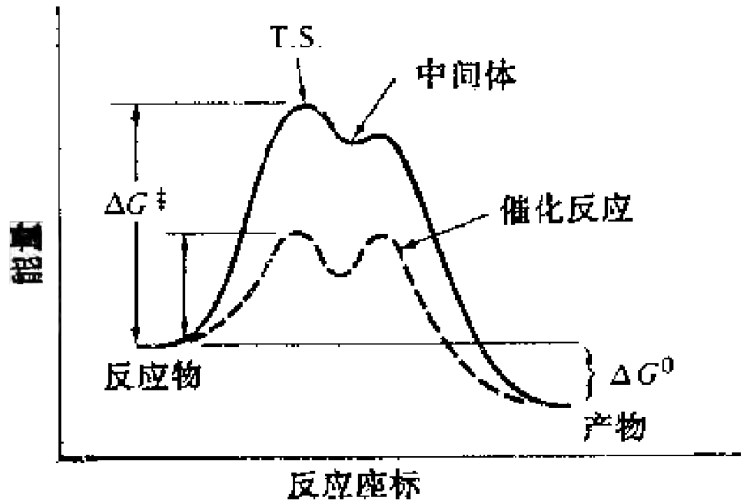
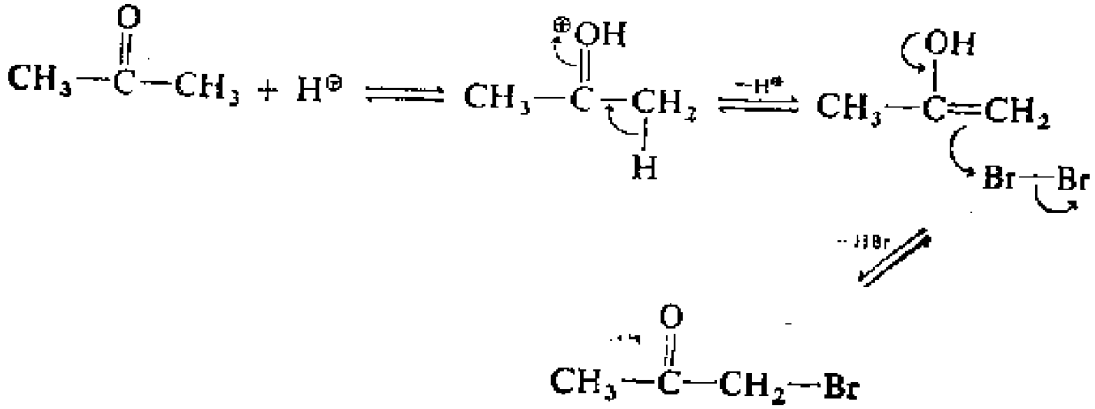
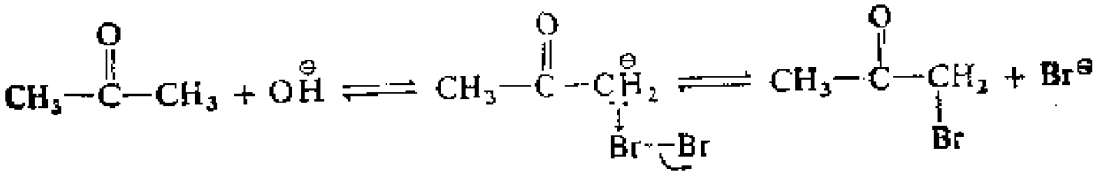


图4-1 反应的自由能图

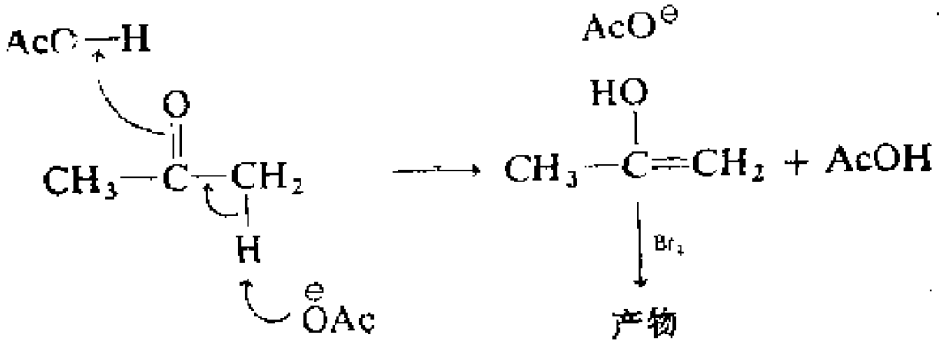
催化剂可分为均相的和非均相的。在均相催化中，催化剂表面和相之间不存在界线(层)。均相催化剂可进一步划分为狭义酸(specific acid)、狭义碱(specific base)、广义酸(general acid)、广义碱(general base)、亲核及亲电催化剂。狭义酸只是质子，狭义碱为氢氧离子，广义酸和广义碱则可以是其他的质子供体及质子受体。以丙酮溴化为例，其可通过狭义酸催化的烯醇化进行反应。



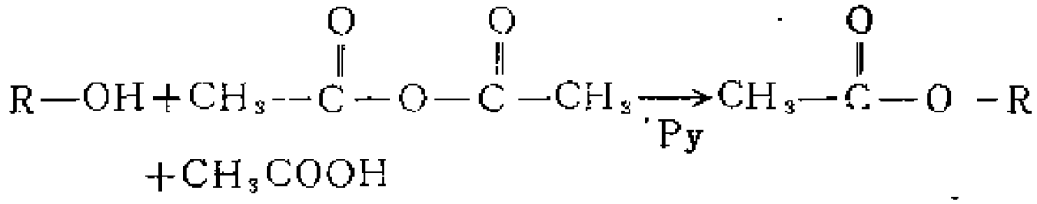
该反应也可以通过狭义碱催化进行。



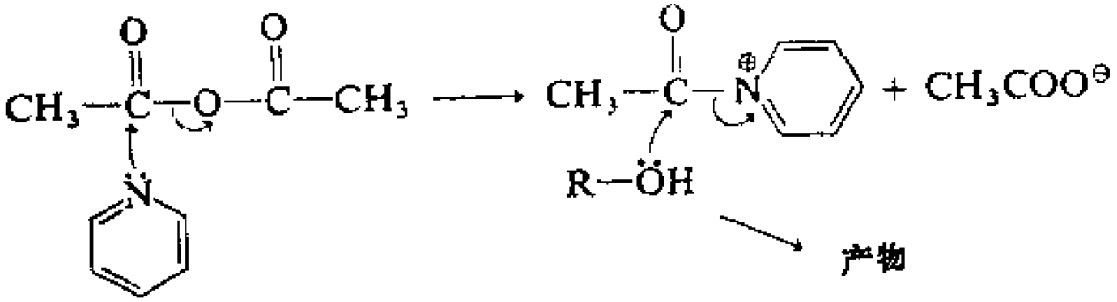
它还可以经过广义酸或碱催化，例如在醋酸/醋酸钠缓冲溶液中，广义酸和碱催化所发生的反应如下：



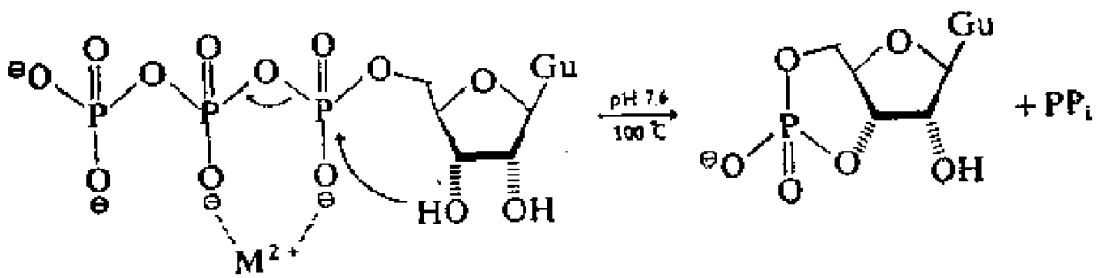
亲核催化可认为是通过一个亲核取代反应的催化。如果原反应物进行的亲核反应是慢的，那么亲核催化剂可先进攻反应物，得到一个比原反应物容易发生亲核置换的中间体，从而加速反应。例如醇与乙酸酐在吡啶溶液中的乙酰化反应。



初看起来，吡啶好像只起到中和乙酸的功能，实际上并非如此。吡啶先与酸酐生成的共价中间体具有吡啶镓盐的结构，因而增加了羰基的活性。

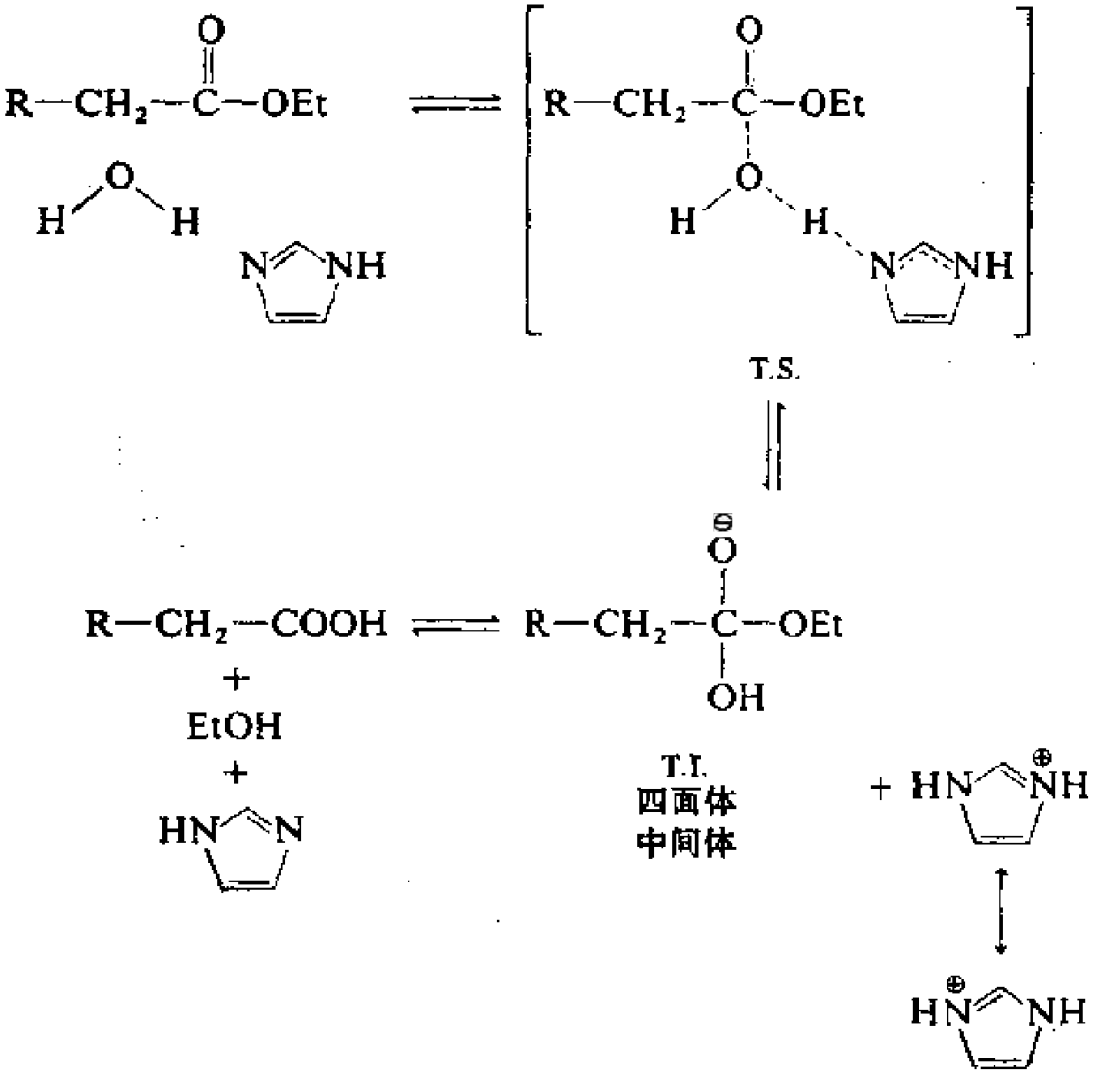


亲核催化是催化剂提供电子给底物，而亲电催化是催化剂从底物获得电子或电子密度。金属离子是最好的亲电催化剂。在磷酸酯的化学中亲电催化是非常重要的，例如从鸟苷三磷酸酯合成3′,5′-环鸟苷单磷酸酯(cGMP)，若以二价金属离子〔如Mg(Ⅱ)，Mn(Ⅱ)，Ba(Ⅱ)，Zn(Ⅱ)，Ca(Ⅱ)等〕为催化剂，则反应速率显著增加。



ATP的水解也是受到金属离子的催化。在以上两个例子中，金属离子与三磷酸根的氧原子形成金属螯合物，降低了磷原子的电子密度，从而使磷原子更具有亲电性，即增加了亲核反应的速率。

广义碱催化和亲核催化是在酶促反应中极为常见的两种催化方式，如何区别这两种催化是个重要的问题。下面是咪唑作为广义碱催化羧酸酯的水解。咪唑从进攻的水分子中接受一个质子，因此水分子中的氧获得了更多的电子密度，从而增强了进攻羰基的能力。



从以上反应可以看到，在过渡态中涉及到水，那么在 D_2O 中完

成该反应时。由于D-O键比H-O键强，因此交换一个重氢所需的能量要高一些。实验证明在D_2O中咪唑的碱催化比在H_2O中低2-3倍，但若在H_2O和D_2O中进行亲核催化，则反应速率是相同的。唑咪是弱碱，在水解活性较高的羧酸苯酯中，可直接作为亲核试剂，进行亲核催化水解反应，但在活性低的羧酸醇酯中，咪唑只能作为碱催化水成为氢氧根而起广义碱催化作用。

以上我们只考虑了均相催化，即所有的反应物和催化剂均在同一相中（在溶液中）。非均相催化是至少有两相存在于混合物中，最常见的类型是固相催化剂在气相或液相中与反应物接触的体系。非均相催化的典型例子是乙烯在金属催化剂如钯、铂或镍存在下的氢化反应。催化剂的作用是使氢和乙烯分子接触而发生反应。反应物对金属表面具有亲和力（通过乙烯的π电子），而产物乙烷则没有这种亲和力，于是脱离金属表面，使更多的反应物分子接近金属表面。

4.2 酶的催化作用

酶有以上两类催化剂的特征。为了催化特定的化学反应，酶可用均相催化中提到的任何催化方式。例如α-糜蛋白酶组氨酸残基的咪唑环可作为广义碱催化剂，而在碱性磷酯酶中，组氨酸残基的咪唑环又是亲核催化剂。的确，酶是复杂的催化剂，当它起作用时，使用的不只一个催化参数。酶可将逐个催化过程成功地结合为一体，这些因素的结合使酶成为特效催化剂。但酶在许多方面又与非均相催化很相似，底物分子碰撞固体催化剂表面的活性部位，形成一个吸附复合物，吸附的底物受活性部位催化基团的影响，发生一步或多步反应，最后，产物分子从活性部位解吸。活性部位和底物与活性部位之间形成复合物的概念在酶催化和非均相催化中都是常见的。然而，它们在某种意义上仍有基本不同之处，绝大多数酶的每个分子只有一个活性部位，而非

均相催化剂的每个分子则有许多活性部位，而且这些部位不需要完全相同。

酶的催化作用发生在其特定位置，这个位置称作活性中心或活性部位。活性部位是由与底物的结合方式和专一性有关的氨基酸残基组成，而且，只是这些氨基酸的侧链才直接参与催化过程，并常以互补的方式协同作用。

氨基酸序列或酶的一级结构支配着二级和三级（三维）结构；亦即肽链折叠以形成带有合宜空穴的球形大分子，这个空穴可容纳底物及需要时容纳辅酶。酶有复杂的和紧密的结构，极性的氨基酸在分子表面朝向溶剂，而非极性部分通常是定向于远离溶剂的分子内部，因此酶内部的微环境是疏水性的。三维结构是由大量的分子内非共价、非极性或疏水相互作用、离子相互作用、二硫键、氢键以及盐键等维持着。

酶促反应的特点是反应的高效性和专一性。这里，我们先考虑与酶的高效性有关的因素，即究竟哪些因素使酶成为高效催化剂。有关专一性方面的内容将在以后各章节中分散讨论。

4.2.1 与酶的高效性有关的因素

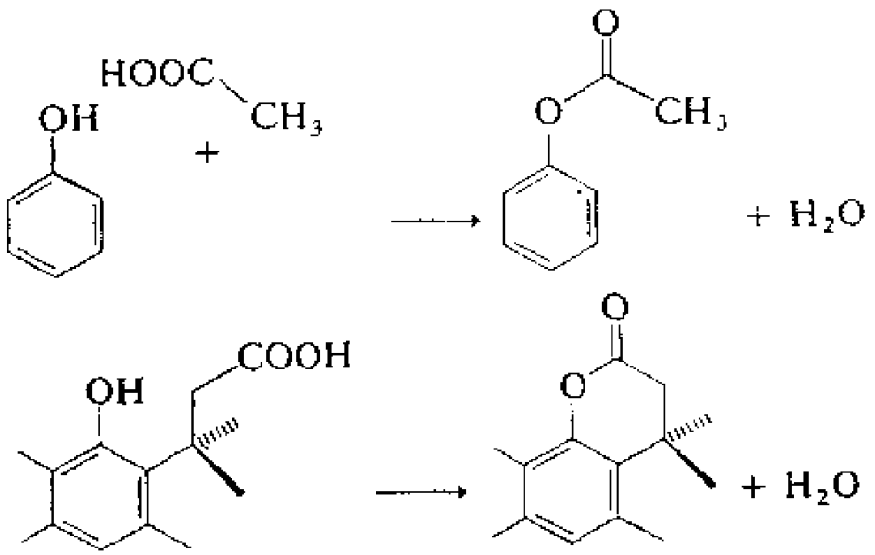
酶是天然的最有效的催化剂，没有任何人工催化剂能像酶那样，在温和的生理条件下具有那么强的催化效能。酶催化反应速率比与其相似的非酶催化的反应速率可增加10^{10}–10^{14}倍。

一般来说，使酶具有高度催化活性的因素有以下四个方面：第一，活性中心的化学结构。它可以将底物键变形或极化，而使底物升高基态能量更具反应活性；第二，结合部位。它可以固定底物，使底物与其他参与化学变化的反应基团接近，因而使很多反应成为分子内反应，此称为接近效应（proximity effect）；第三，底物正确的和有利的定向，使在进行每一步反应时底物的键只发生最小程度的移动或旋转运动，因而使反应只需最低的活化能。当然，活性部位的合适电荷分布及活性中心的有利几何状

态也是影响过渡态能量的两个因素；第四，多功能基团的协同催化作用。酶的活性部位在不同程度上具有所有这些因素，而且它们彼此不能分离，共同促进酶的反应速率，使酶成为最强有力的催化剂。这些因素可借助于模型体系来说明，几个生物模拟化学反应所得到的速率的增加与类似的酶催化反应速率的增加幅度相近。

4.2.2 分子内的催化作用

在有机体系中，分子内酸-碱催化是催化反应的有效方式。在酶和溶液化学之间有一个基本不同之处是，溶液催化的速率常数是二级的，即反应速率随着催化剂浓度的增加而增加，而酶-底物复合物进行的反应是一级的，催化的酸或碱是分子的组成部分。在酶-底物复合物中，酸和碱催化剂的重要性可以合成带有催化基团的底物模型化合物来说明，并可与相应的分子间反应的反应速率进行比较。例如，第二个反应是分子内的反应，其反应

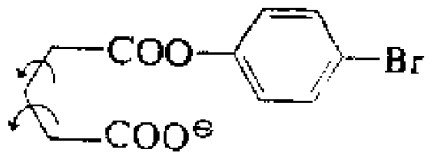


速率比相应的分子间反应增大10^{15}倍，甚至在碱中也能发生内酯化。由于立体障碍，芳香环上的甲基恰好在侧链的偕二甲基之间，从而使体系固定在有利于羧基与酚羟基成键的位置，这样，羧基的有效浓度非常高。分子内基团的高“有效浓度”是酶催化

比分子间催化有效的最重要原因之一。这里，环合的结果也能减轻分子内存在的较大的基态张力。

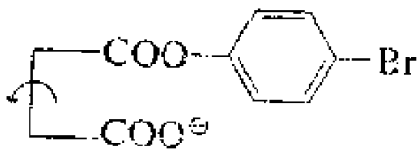
因而，酶的一个功能是通过在活性部位结合底物，将底物带至酶的催化功能基团的附近。这就涉及到体系熵的改变。在形成酶-底物复合物时，熵的损失可通过复合物形成的热焓来补偿。当复合物进一步发生催化反应时，酶的分子内催化效果就超过分子间反应。因为分子间反应包括两个或更多个分子结合形成一个分子，导致“有序”增加，从而引起熵的损失；而酶的分子内的反应是由一分子复合物形成产物及酶二个分子，因此引起熵的增加，有利反应的进行。

分子熵是由平移熵、转动熵和内熵的总和组成。1960 年 Bruice曾指出，分子内反应速率的增加是由于限制不利的旋转异构体分布造成的[1]。为证实此观点，他研究了对-溴酚分子内置换反应（先形成酸酐中间体）并发现，化合物分子的刚性增加，

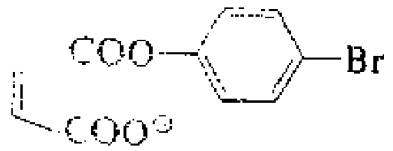


形成二酸的相对速率

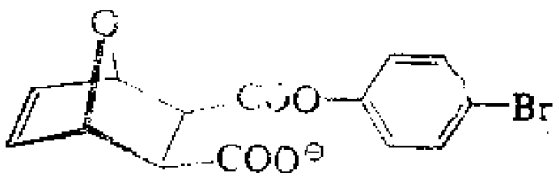
1



200



10300



53000

反应速率也增加。从以上可以看到，移去一个自由度，反应速率约增加 200。对于刚性分子，反应基团是以适合反应的方式排列着，因此反应速率增加非常多。在这些反应中，速率的增加是接

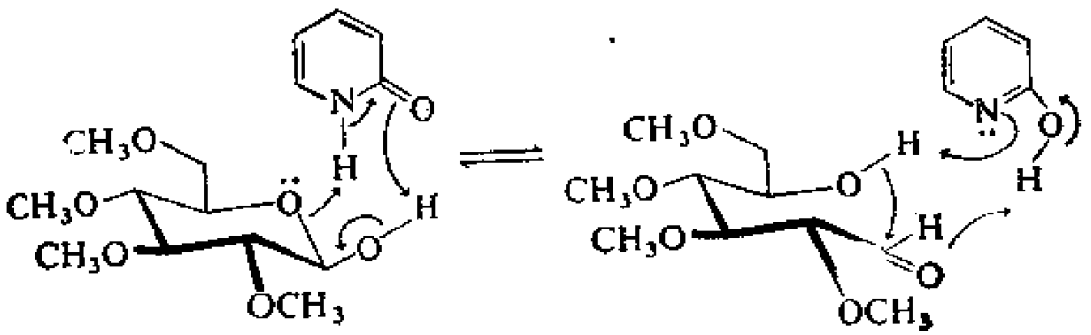
近效应的直接后果。此结果有利于改变平移和转动活化熵。Bruice认为“冻结”底物内部转动，加上熵效应，是解释酶催化高效性的主要因素。不过，Jencks认为内在结合能才是使酶具有反应高速率的主要原因。这个内在结合能是酶与底物在催化部位有利的非共价相互作用的结果[2]。

溶剂化因素也可影响分子内反应。在稀溶液中，基态时分子内亲核试剂比分子间亲核剂被溶剂化程度少得多。酶的催化基团与底物是处于疏水性的微环境中，含水量极少，再加上相互接近，因此溶剂化程度很低，而且酶内部的非极性环境与低介电常数的有机溶剂类似，溶剂分子不再阻碍静电相互作用，所以酶的催化基团与底物有较强的相互作用。

4.2.3 多功能催化作用及简单模型

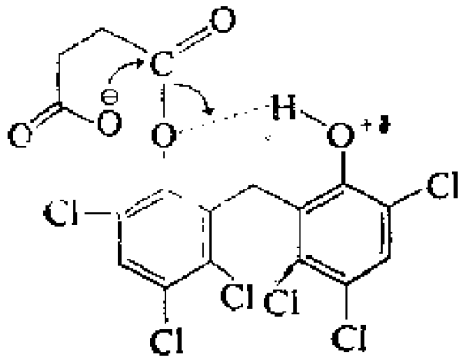
多功能催化作用是解释催化反应的基本概念之一。该概念指出酶的活性中心有几个功能基团与底物有适宜的排列，因此可以进行协同催化。

在溶液化学中最早的一个例子是研究在α-吡啶酮存在下O-四甲基-D-葡萄糖的变旋速度[3]。10^{-3}mol/L α-吡啶酮溶液比相同浓度的酚和吡啶的功效高7000倍。研究者们提出反应以协同的机理进行，催化剂既作为一个碱又作为一个酸。

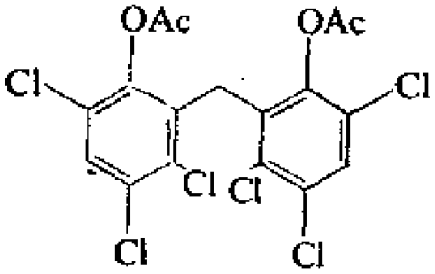


2-氨基酚是一个比α-吡啶酮更强的酸和碱，但它不是一个强的催化剂，在2-氨基酚的存在下，协同催化是不可能的。

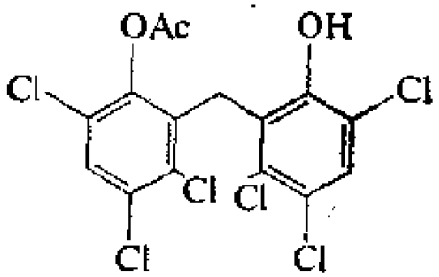
另一个双功能催化的典型例子是六氯二苯甲烷酚单琥珀酸酯的水解[4]。羟基的接近和参与有力地加速反应。类似地，比较



相应的单乙酸酯和二乙酸酯表明，在低于pH5时，单乙酸酯比二乙酸酯的反应速率加快500倍。

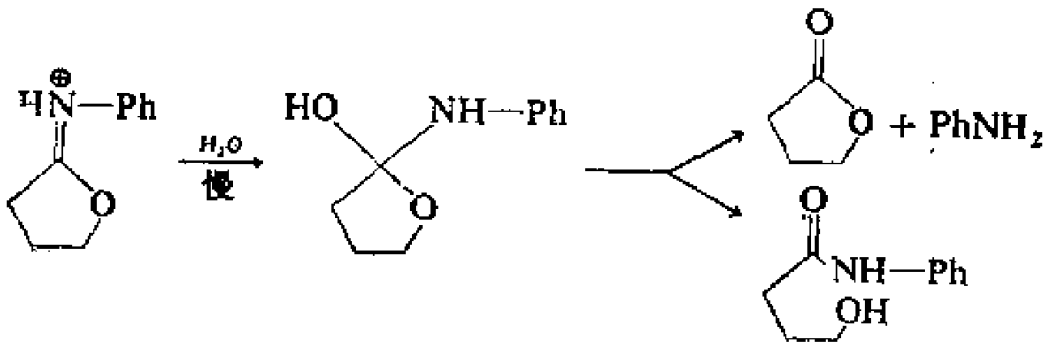


二乙酸酯

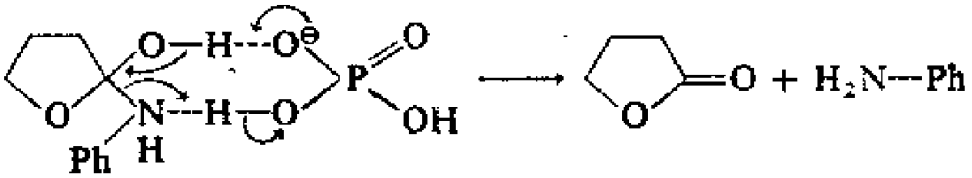


单乙酸酯

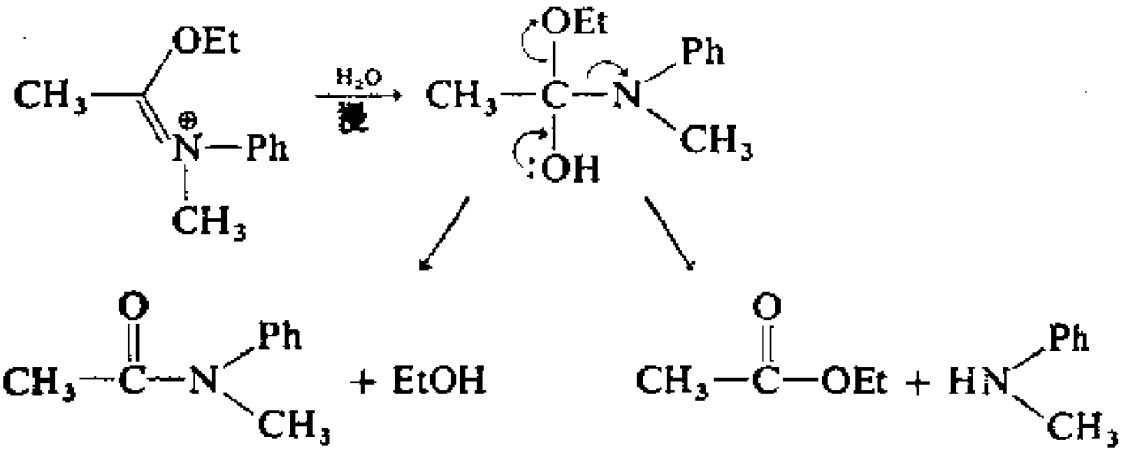
Cunningham和Schmir[5]研究了亚胺内酯的水解，他们观察到磷酸盐缓冲溶液的功效至少是咪唑缓冲液的200倍（即使两种



缓冲液在催化释放苯胺时具有几乎相同的pKa)。在碱性pH时，将选择生成酰胺的途径，这是由于酰胺的氮原子是一个不好的离去基，此情况在咪唑缓冲液中观察到。然而，在磷酸盐缓冲液中，双功能催化使释放苯胺成为更有利的方式。



Lee 和 Schmir[6, 7]以非环亚胺酯更详细地研究了类似的双功能催化机理。这里，水解同样以形成一个四面体中间体作为限速的一步，随后中间体断裂，得到酰胺或酯。



若无缓冲剂，酰胺产量随pH增加而增加。pH7.5时，得到50%酰胺和50%酯。然而在双功能催化剂存在下，则有利于胺的生成。参看表4-1。

除丙酮肟外，所有双功能催化都在1,3-关系位置中含有一个酸性和一个碱性基团。环状过渡态需要一个协同质子转移，以组成一个八元环，下面以磷酸盐为例来说明。一旦形成环状过渡态，即将发生类似于亚胺内酯那样的键断裂，获得苯胺和酯类化合物。咪唑在1,3-几何位置上有一个酸性和一个碱性功能基团，但这些基团的立体障碍不适宜于环质子的转移。

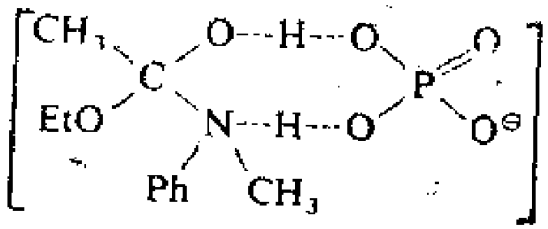
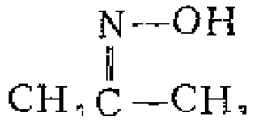
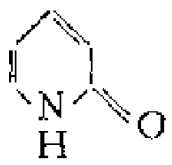
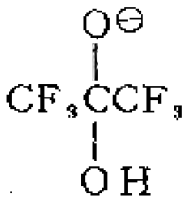


表4-1 在各种不同缓冲溶液中，非环亚胺酯的水解

缓冲液	研究的pH范围	速率比例[a]
HCO_3^-	7.49–9.73	290
	7.73–8.85	8700
	7.92–8.55	1460
HPO_4^{2-}	6.96–9.11	52
$HAsO_4^{2-}$	7.18–8.82	
$H_2AsO_3^-$	7.42–8.99	150
	7.13–8.90	47

a 指的是双功能催化剂与其相同pKa的单功能催化剂形成胺的速率比例

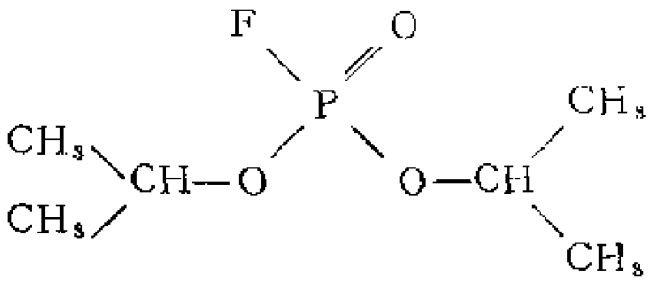
4.3 α-糜蛋白酶(α-Chymotrypsin)

酶促反应一般分两步进行（按单一底物考虑）。第一步是酶（E）与底物（S）作用生成酶-底物复合物（ES）；第二步是复合物分解，形成产物（P），释放出游离的酶（E），各步反应均为可逆。

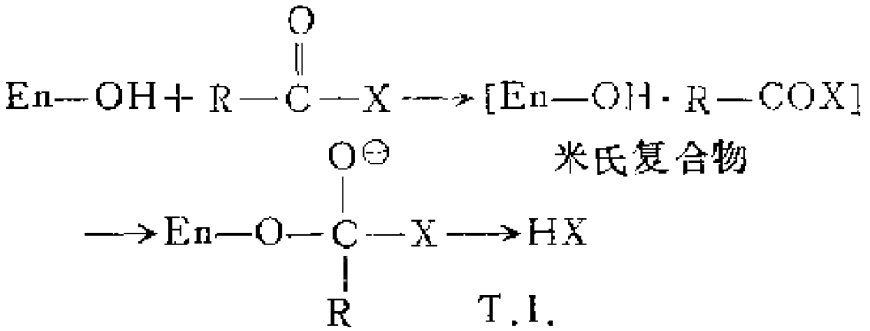
$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons P + E$$

酶　底物　米氏复合物　产物　酶

酶催化的机理是一个具有很大魅力的主题。研究最多的一种酶是α-糜蛋白酶。在此酶的活性部位有一个丝氨酸（Ser-195）羟基，这个羟基对不可逆抑制剂二异丙基氟磷酸（DFP）有着不寻常的反应活性。高反应活性的 P-F 键很容易被亲核试剂如水解蛋白酶的活性丝氨酸羟基所置换。含有这种基团的其他的酶是胰蛋白酶、凝血酶和枯草杆菌蛋白酶。它们总称为丝氨酸蛋白酶。



α- 糜蛋白酶的生理功能是催化水解在哺乳动物肠胃中蛋白质食物的肽键。D.M.Blow 从X-射线衍射研究确定了其三维结构[8]。Hartley和Birktoft 共同研究说明了其作用机理[9, 10]。α- 糜蛋白酶选择性地水解芳香氨基酸羧基形成的肽键。芳香氨基酸酯对该酶也是好的底物，多数动力学数据都是由酯作底物得到的。

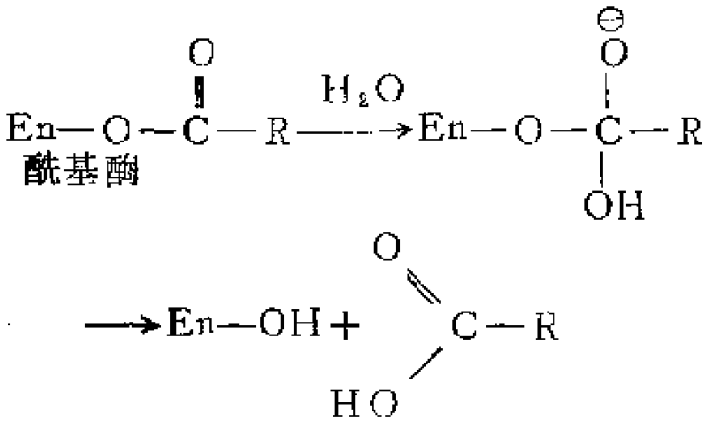


米氏复合物

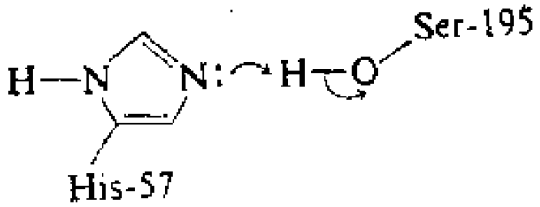
T.I.

X=OR′, NHR′

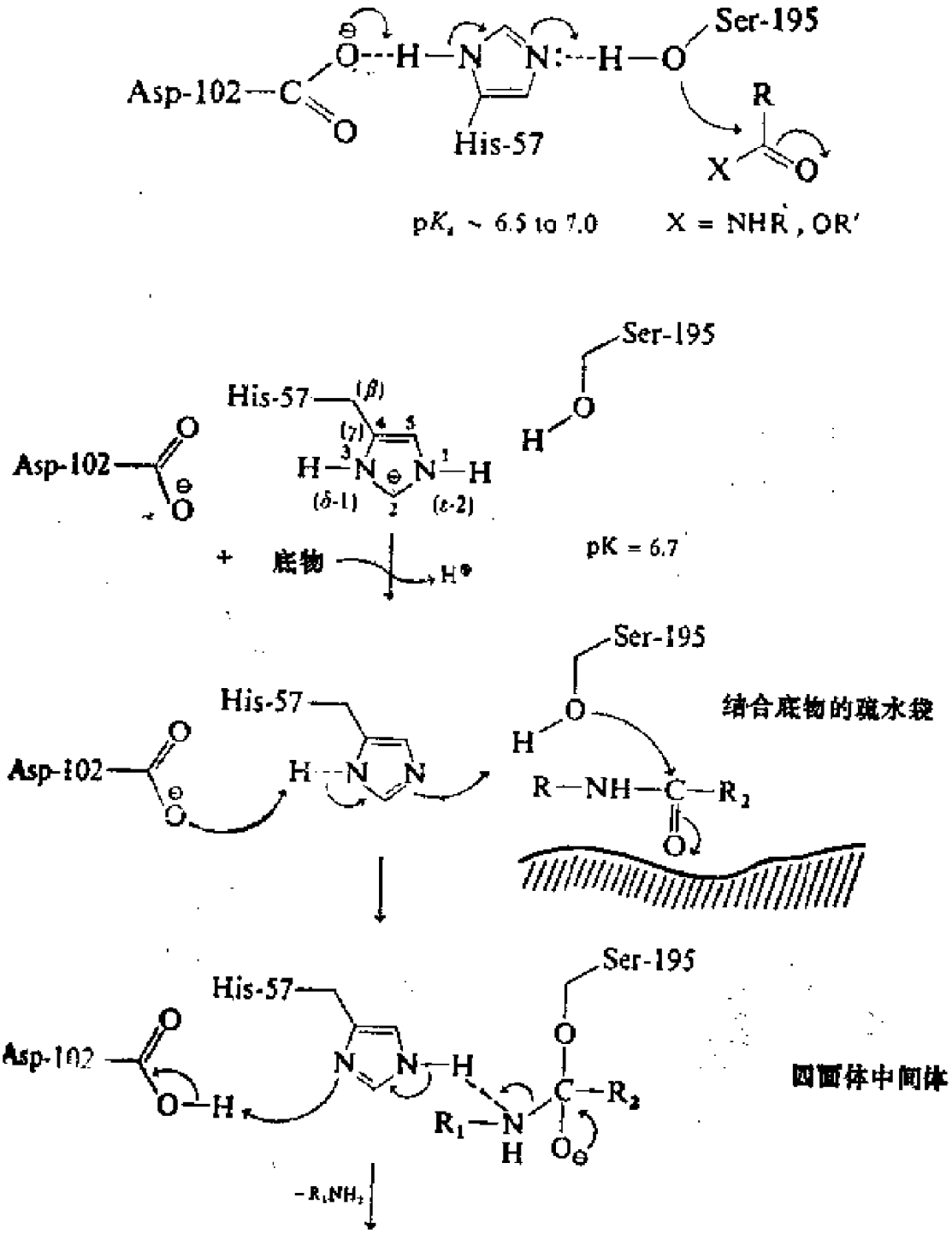
R=Phe, Trp, Tyr



在很长时期内一直认为咪唑残基 His-57的碱性使Ser-195羟基的亲核性增加。然而根据 α- 糜蛋白酶的 X-射线分析，又提出了广义催化的新形式：Asp-102、His-57和Ser-195 通过氢键连接排列，构成一个氢键体系(图4.2，)这个氢键体系又可称为电



荷传递体系或电荷中继网。在多数情况下，体系中Asp-102以离子化形式存在，而 Ser-195 以非离子化形式存在。Asp-102基团的功能是极化咪唑环，这是由于羧酸根的负电荷可吸引与其邻近的咪唑环的质子，极化的咪唑环就有可能发生沿着氢键的电荷的转移，使Ser-195 的羟基质子转移至 His-57，Ser-195 残基变成一个能进攻肽键的活泼的亲核试剂，与底物生成第一个四面中间体，然后由此中间体经C—N键的断裂转化为酰基酶。第二步是水分子进攻酰基酶，生成第二个四面体中间体，然后带有烷氧基的丝氨酸（连同酶）作为离去基离去，羧酸作为产物得到。丝氨酸的烷氧基又可从电荷传递体系中获得质子，恢复成原来状态，并开始第二个分子底物的水解。


Ser-195
Asp-102
His-57
R
X
pK_a ~ 6.5 to 7.0
X = NHR', OR'
(β)
(γ)
(δ-1)
(ε-2)
底物
pK = 6.7
结合底物的疏水袋
四面体中间体

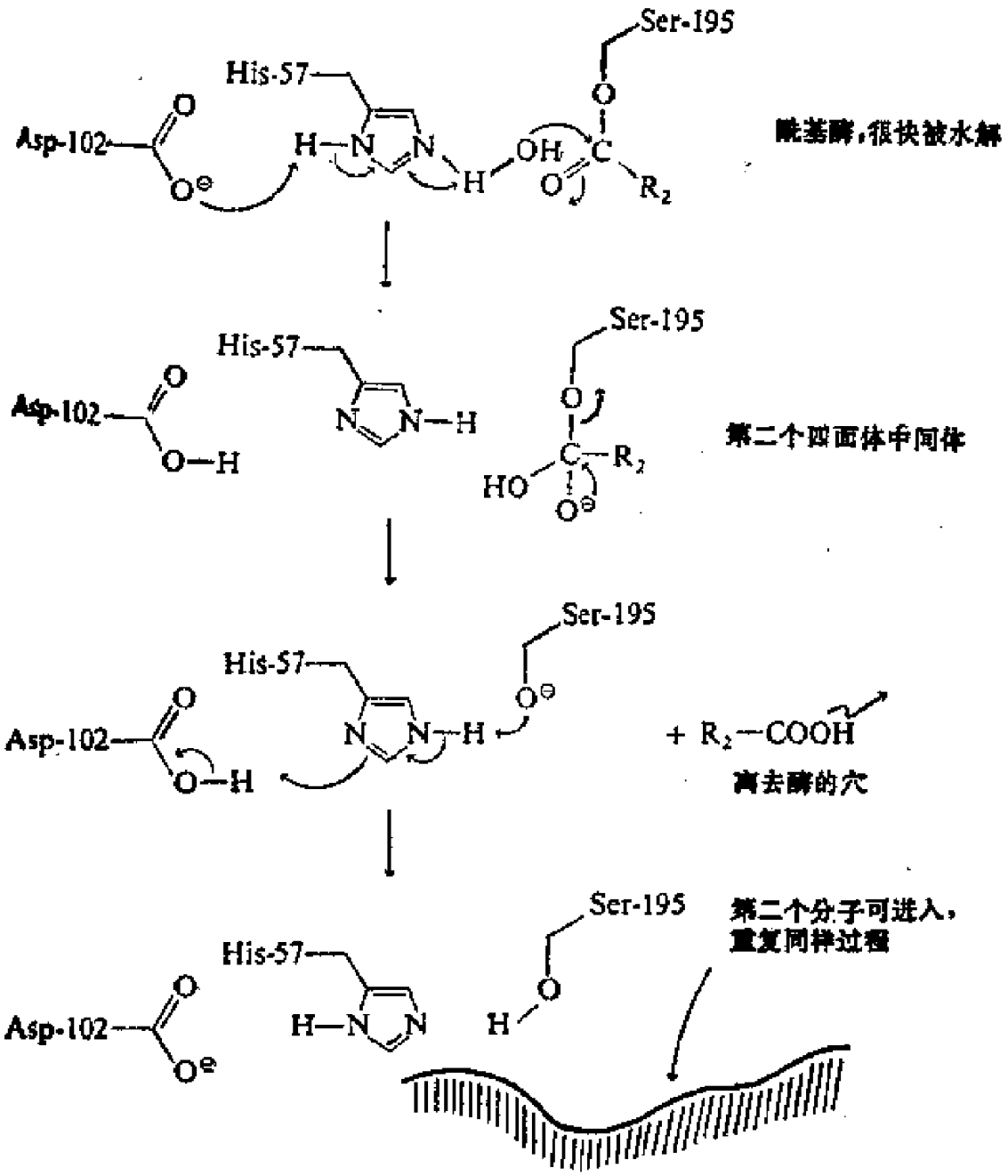


图4-2　α-胰蛋白酶的电荷传递体系

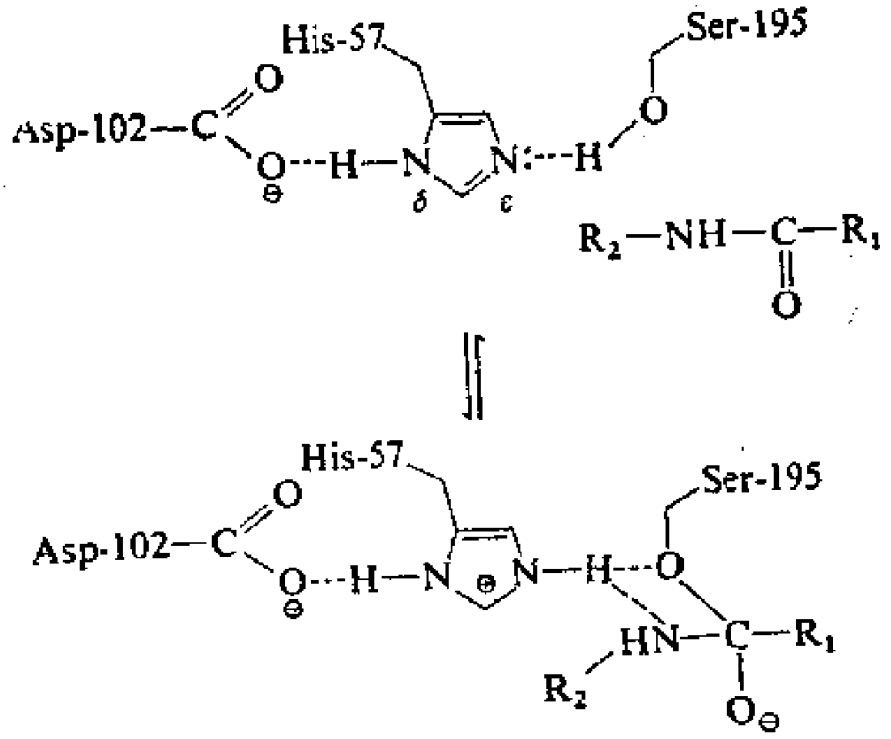
（常指咪唑基的3位为$N\delta_1$或π，1位为Ne2或τ）

α-糜蛋白酶的催化效能不能单独归功于电荷传递体系的存在。X-射线研究[11]指出，在催化过程中许多参数起作用，例如四面体中间体的稳定性是通过底物羰基与Ser-195和Gly-193酰胺上的氢形成氢键造成的，而在糜蛋白酶原中不存在Gly-193的氢键。的确，经X-射线精确测定糜蛋白酶原和糜蛋白酶的结构后表明，在糜蛋白酶原和糜蛋白酶中，上述催化的三联体结构之间关系是不同的。在酶的三维结构中这种构象的改变可以使催化残基的化学性质发生重大变化，它在酶原激活增强酶活性上可能起着重要的作用。

从 Myxobacter 495 中的丝氨酸蛋白酶（名为α-溶解蛋白酶)催化水解对硝基N-酰基苯胺肽底物的实验中，证实了四面体中间体的存在，以及由Ser-195至His-57和从His-57至Asp-102的协同的质子转移机理[12、13]。水解的限速一步是四面体中间体分解为酰基酶和对硝基苯胺。根据实验结果认为，是在这一步发生两个质子协同（而不是逐步的）的转移。但对此观点也有一些争议，Markley 小组在对糜蛋白酶原、α-糜蛋白和胰蛋白的高分辨^{1}H-NMR研究工作中[14]指出，酶原和酶中His-57离子化的pKa比Asp-102的要高，因此，Markley倾向于以下机理，此机理在形成四面体中间体这一点上与图4-2不同(图示见下页)。

酶原和酶的^{1}H-NMR都清楚地证实了 His-57-Asp-102 离子对的存在[15]，所以未必是两个质子协同转移的机理。

了解在α-糜蛋白酶催化反应的过渡态中活性部位 His-57 的pKa是非常有意义的，这方面的艰巨工作还是由 Markley 小组来完成[16]。他们观察到一系列二异丙基磷酰丝氨酸（DFP-Serine）蛋白酶的^{31}P-NMR化学位移对pH的依赖关系。从滴定工作所得的pKa值与较早的从^{1}H-NMR数据得到的各个 DFP 衍生物的pKa值是一致的。当 Ser-195 被衍生化时，所研究的三种酶（α-糜蛋白酶、胰蛋白酶和α-溶解蛋白酶）的 His-57pKa 值都增加（α-溶解蛋白酶的pKa增加 2.0单位）。由于像 DFP 这种

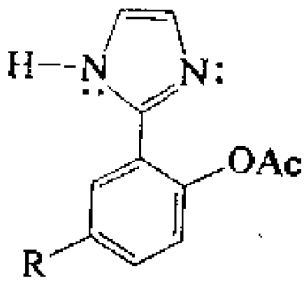


抑制剂可看作是丝氨酸蛋白酶的过渡态类似物，Markley建议在DFP衍生物中的His-57增加的pKa值可以代表过渡态 pKa 的近似值。在游离酶中 His-57 有较低的pKa的事实，说明了在生理 pH 条件下咪唑基具有未质子化的形式[16]。在底物-酶复合物形成后并到达过渡态时，His-57 的 pKa 值上升，使唑咪成为更有效的碱，以接受 Ser-195 羟基的质子。显然，生物物理技术如核磁共振光谱在说明丝氨酸蛋白酶作用的正确机理中起了关键作用。

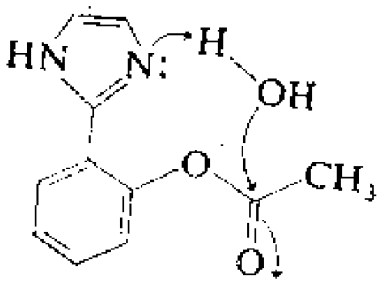
4.3.1 电荷传递体系的模型实验

Rogers 和 Bruice 用模型化合物进行了广泛研究，以说明电荷传递体系的正确性[17—20]。下面的模型化合物表明，其乙酸酯的水解速度比苯基乙酸酯和咪唑混合物的水解速度增加 10^4 倍。在中性条件下可能的催化机理图示如下页。

1977 年 Komiyama 和Bender[21]以2- 苯并咪唑乙酸为模型，考察了广义碱催化氯乙酸乙酯的水解。水解速度比无羧基的

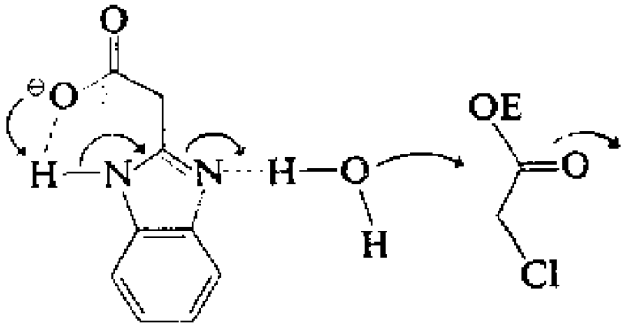


R = H, $SO_3^{\ominus}$

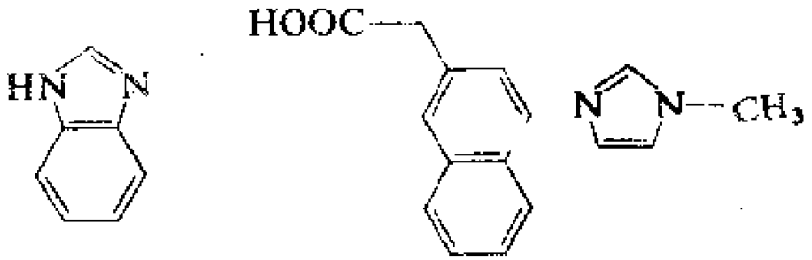


广义碱协助的H_3O进攻

苯咪唑增加 8 倍，这说明了羧基协助了广义碱催化。



但是若只有羧基如β-萘乙酸则不能催化反应，因此机理包括羧基阴离子、咪唑和水的协同作用。相应于甲基化的 α-糜蛋白酶，N-甲基咪唑同样可作为模型，试验证明氯乙酸乙酯完全不发生水解，这说明在电荷传递体系中，咪唑环上的两个氮一定是以游离状态参与传递。



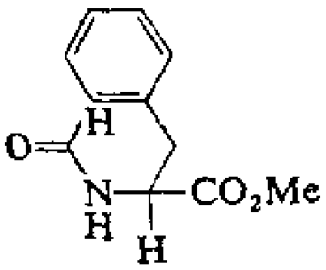
苯并咪唑　　β-萘乙酸　　N-甲基咪唑

His-57甲基化的α-糜蛋白酶比α-糜蛋白酶的活性降低至10^5分之一[22]，这说明只是在 His-57活性部位上的微细改变，就使

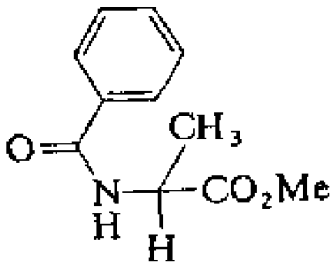
过渡态和四面体中间体变得不稳定。

4.3.2 结合底物的绝对构象

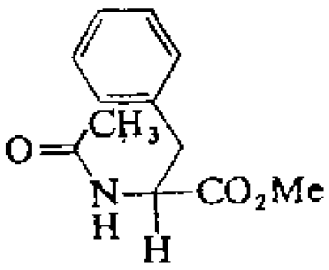
底物在活性中心的确切定向是怎样的？与催化基团有关的易断裂键位于何处？Hein 和Niemann 通过应用对α-糜蛋白酶的简单模型回答了这些问题[23]。他们首先用一个构象上受约束的分子——对 N-乙酰基 L-苯丙氨酸甲酯(L-APME) ——作为模型来阐明α-糜蛋白酶-结合底物的优选构象。Niemann研究了D-和 L-1-酮基-3-甲酯基-1,2,3,4-四氢异喹啉(KCTI)的动力学行为。KCTI 是一个类似于 L-APME、N-甲酰基-L-苯丙氨酸甲酯 (L-FPME) 和 N-苯甲酰基-L-丙氨酸甲酯 (L-BAME) 的刚性物质。L-APME、L-FPME 和 L-BAME 三种化合物都是α-糜蛋白酶的良好底物。



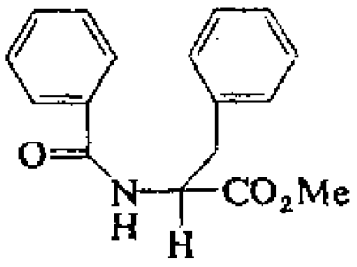
FPME



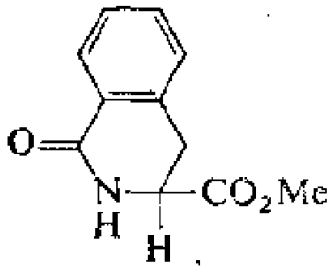
BAME



APME



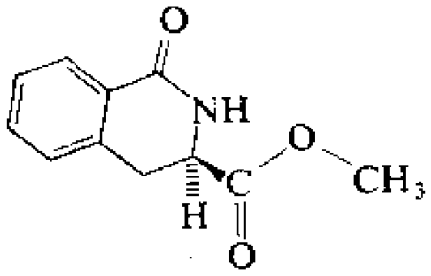
BPME



KCTI
(Niemann)

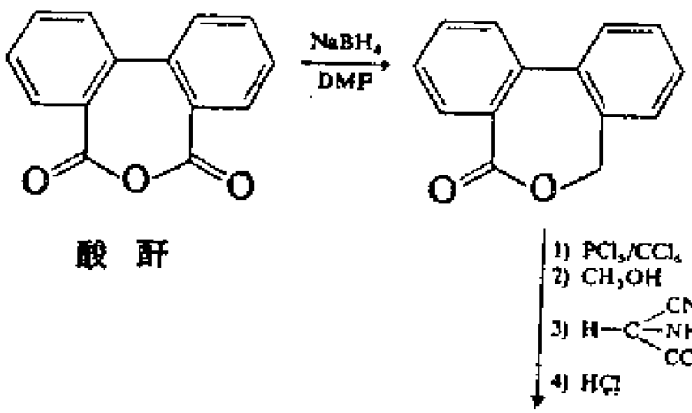
虽然 α-糜蛋白酶对绝大多数氨基酸底物的 L-异构体是立体专一的，但是Niemann试验表明，在 KCTI情况下立体专一性是

相反的。构象上受限制的D-构型酯的水解速度与N-乙酰基-L-苯丙氨酸甲酯相似，而L-异构体则水解非常慢。Hein 和 Niemann[23, 24]指出，这种异常是与 D-KCTI 的羧酸酯基在竖键构象的特点有关，这种构象与开链L-氨基酸酯底物的可能构象相一致。然而，Silver 和 Sone[35]的工作却倾向于酯基团的横键定

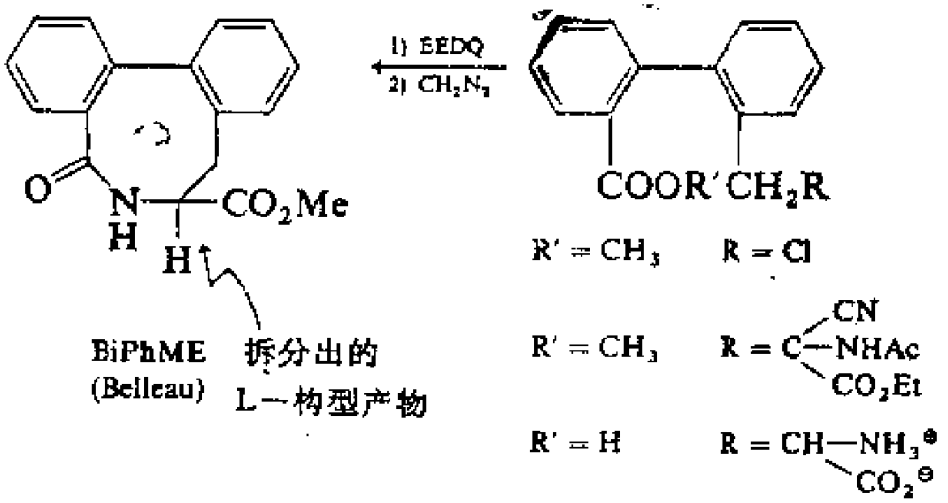


D-KCTI

向。于是这些研究结果引起有关D-KCTI的甲酯基竖键或横键定向问题的广泛争论，以及由此引起酶结合 L-APME 的构象问题[26]。Niemann化合物及其衍生物没有明确地解决酯功能基团是竖键还是横键的定向，原因在于所用的大多数化合物严重地改变了α-糜蛋白酶正常底物的结构特征，因而对模型的有效性产生强烈的怀疑。但是，1968年Belleau和 Chevalier 从联苯酸酐合成一种被约束的底物—3-甲氧羰基-2-二苯吖辛因-1-酮 (Biph-ME)。其合成过程如下：

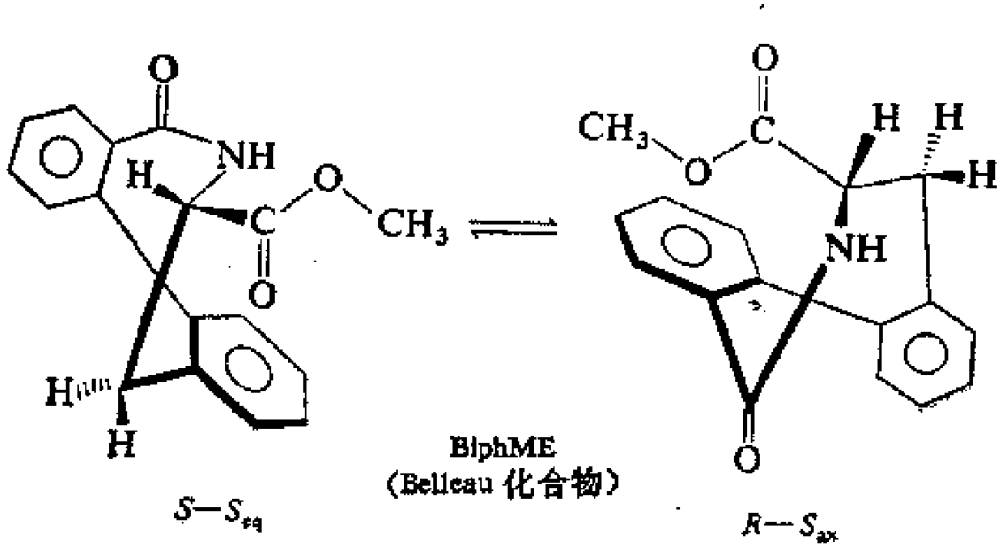


酸 酐

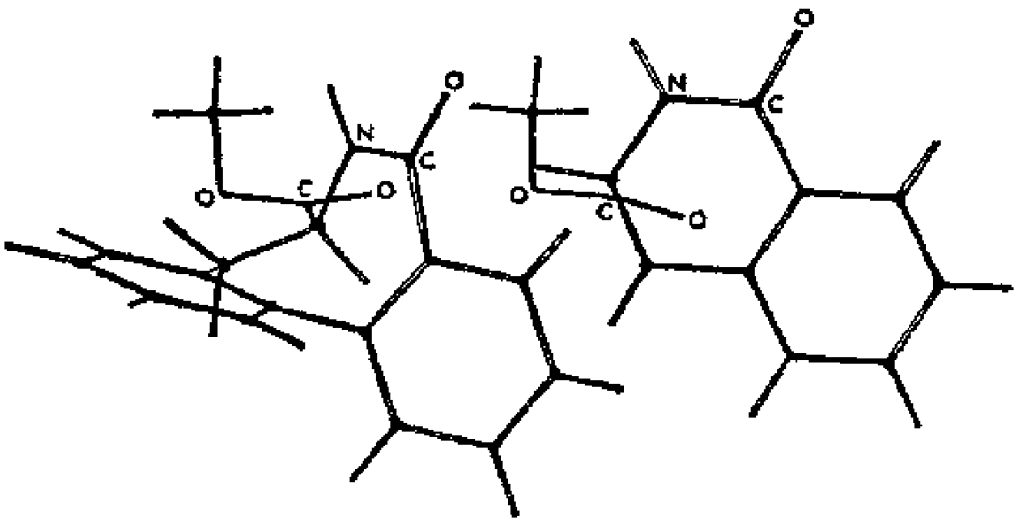


这个2,2′-桥接二苯化合物与 N-苯甲酰基L-苯丙氨酸甲酯(BP-ME) 类似。

此联苯型模型在溶液中以两种可缓慢互换的形式存在，在这两种形式中，酯基或占联苯体系的外边（横键的），或占其里面（竖键的）。α-糜蛋白酶只对S-Seq构象有显著的专一性，另一个形式R-Sax对该酶却是惰性的。实际上，有效构象的水解速度和米氏常数与那些相应的标准底物N-苯甲酰基苯丙氨酸甲酯完全相同。将BiphME的 R-Sax 构象体的新鲜溶液（95:5水-二氧六环）与 α-糜蛋白酶保温时，没有水解发生，若改用久置在二氧六环中的贮存液，则很容易发生 α-糜蛋白酶的催化水解（由于R-Sax经缓慢平衡转成S-Seq之故）。



这样，D-KCTI和BiphME的S-Seq都是α-糜蛋白酶的良好底物。仔细比较一下它们的分子模型(图4.3)可以得到这样的结论：当D-KCTI酯基在α-糜蛋白酶结合状态中是竖键定向时，Niemann化合物（D-KCTI）和Belleau化合物（S-Seq）两者的酯基是可重合的。所以，Niemann化合物和Belleau化合物在分子构象水平上是完全相同的。Belleau 化合物的多面性使它成为对分析α-糜蛋白酶结合底物构象时的一个较好的模型。



Belleau 化合物 (S-Seq)　　Niemann 化合物 (D-异构体)

图4-3　Niemann化合物的D-构型与 Belleau 的二苯模型化合物重合的立体模型

Belleau化合物的R-Sax异构体不仅对水解是惰性的，而且也不能抑制有效的S-Seq异构体的酶促水解。反之，L-KCTI具有很强的抑制酶促的D-KCTI的水解能力，为了了解这种差异，应该认识到Belleau化合物有两个构象，一是甲酯基的定向（以Sax或Seq表示）另一个是联苯体系分子本身的手性（以R或S表示）。通过R-Sax异构体不能抑制S-Seq的水解，可以推断出α-糜蛋白酶在与其底物结合生成米氏复合物时就显示出酶对分子不对称性的专一识别，即只与S-Seq而不与R-Sax结合，这也称为分子手

性专一性。但在KCTI的情况下，由于KCTI分子体系不具手性，因此酶与D-和L-异构体都能结合，差异仅在此后的催化反应，故L-KCTI能抑制D-KCTI的酶促水解。

木瓜蛋白酶（植物的巯基蛋白酶）和枯草杆菌蛋白酶（细菌来源丝氨酸蛋白酶）是不同种系来源的酶，它们的“分子手性专一性”是否相同？联苯型化合物是BPME的分子不对称类似物（BPME是这些酶的良好底物），因此它是回答这个问题的优选者。通过对联苯异构体的试验证明了枯草杆菌蛋白酶的表现非常像α-糜蛋白酶。然而，对木瓜蛋白酶来说，联苯化合物的R-Sax和S-Seq构象都不是有效的底物。这种无效性是由于底物酰胺部分为顺式构型的缘故，也就是说木瓜蛋白酶为了水解其底物，酰胺键需要反向构型。但问题并不那么简单，Elie和Belleau合成了顺向和反向9-和10-元环内酰胺底物类似物，他们发现反式异构体对试验的三种蛋白酶不具备有效的底物性质。虽然这些负结果有些令人失望，然而，他们提出了与底物分子整个形状有关的易断裂键的构象才是决定特定底物反应性的关键。这个决定性参数要看易断裂键在催化中是否被固定在正确方向上。

正如上面提到的，α-糜蛋白酶、木瓜蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶之间存在着相当多的交叉专一性。关于手性专一性研究的结果，最终将有助于揭露哺乳动物、细菌和植物之间趋异进化的新概念。

同样地，在分子药理学中的一个关键问题是不同类型的受体所表现的交叉专一性。这样，药物中对某给定受体有活性的必需结构特征常常引起与其他有关受体部分的相互作用，从而引起不希望的副反应。特定受体手性专一性知识可以使药物设计在专一性方面有更多的改善。由于酶-底物相互作用基本上与之有相同性能，而且蛋白酶比难以捉摸的受体有较少的复杂性和更多的可理解性，因此人们希望蛋白酶手性专一性的系统试验，可在较简单的水平上对发展受体-特异效应物方面，提供一个更合理的根据。

4.4 溶菌酶

在第3章我们已讨论了核糖核酸酶A，第7章还将详细阐述肽链端解酶，羧肽链A。目前研究得较多的还有溶菌酶(lysozyme)。

溶菌酶存在于鸡蛋清和动物的眼泪中。其功能是催化某些细菌的细胞壁的多糖水解。这种多糖是由N-乙酰基葡萄糖胺（NAG）和N-乙酰基胞壁酸（NAM）通过β（1→4）交替地排列所形成的共聚物（图4-4）。

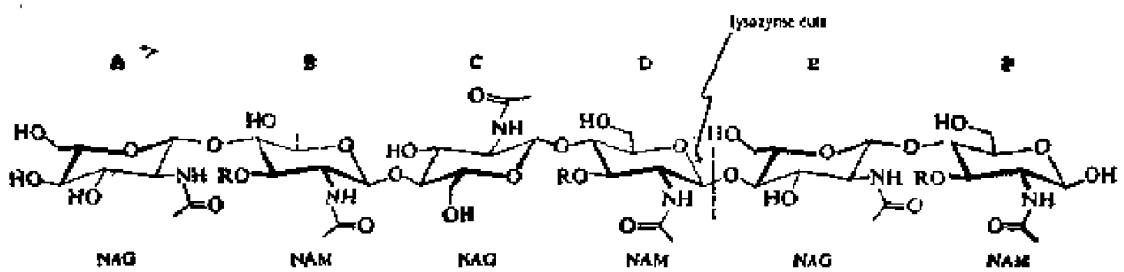
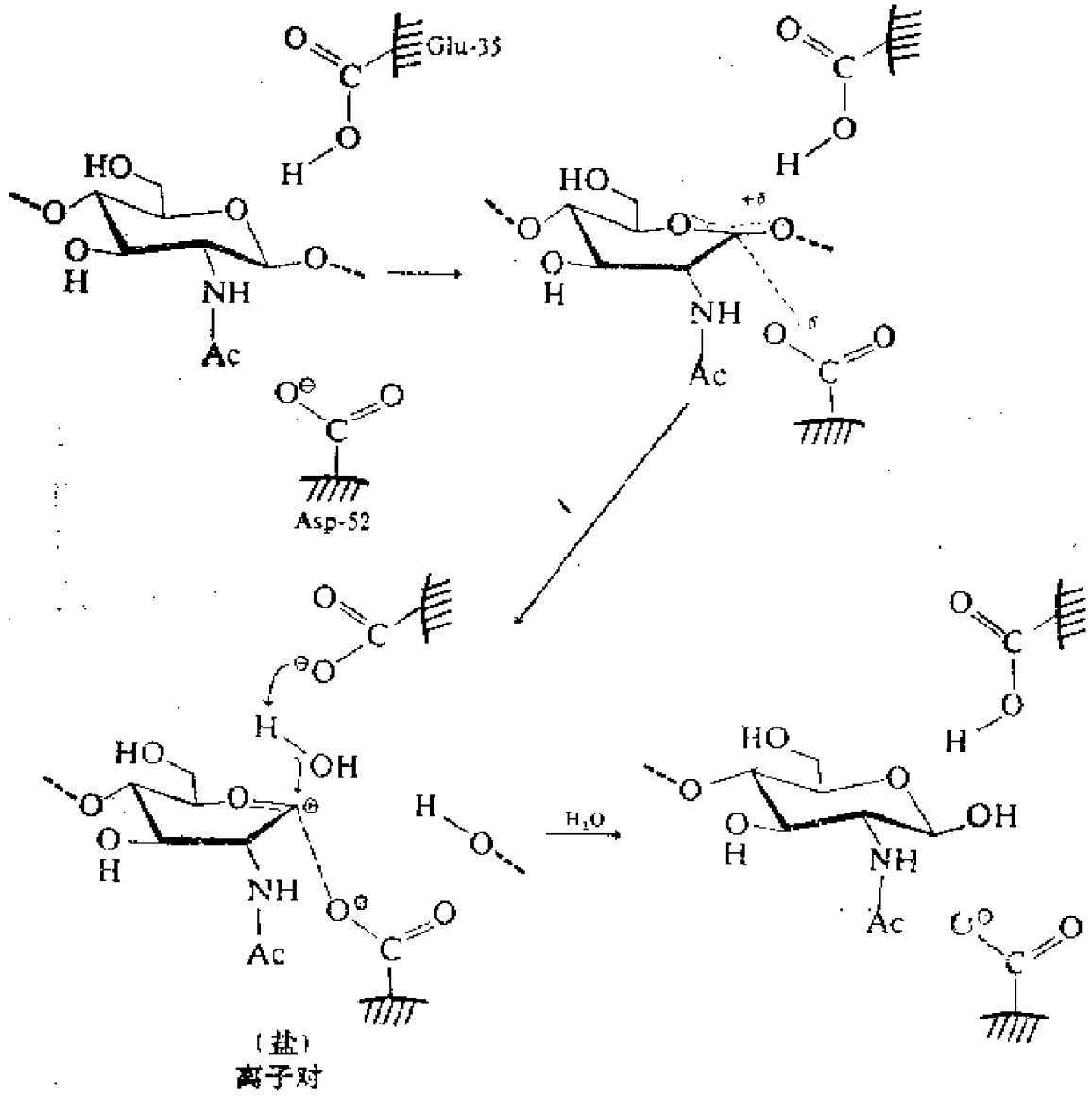


图4-4　结合在溶菌酶活性中心的多糖结构
箭头所指为溶菌酶切割处

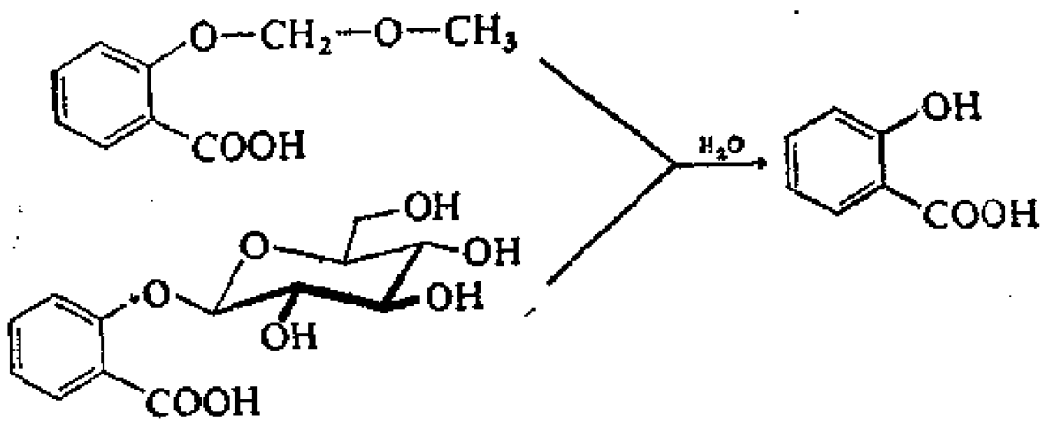
溶菌酶具有129个氨基酸残基的多肽链。它是在1967年第一个从X-射线结晶法阐明其三级结构的酶[27]。整个酶分子有一个狭长的凹穴，底物与酶结合时正好与酶分子中的长形凹穴相嵌合。在凹穴中Glu-35未离子化的羧基和Asp-52离子化的羧基是活性部位的两个氨基酸残基。凹穴分为六个亚部位：ABCDEF。NAM残基只能与B，D和F结合，而合成的底物NAG残基则可以在所有亚部位结合。溶菌酶只断裂位于D和E之间的键。溶菌酶的作用方式表示如下图。

Glu-35作为广义酸催化剂，Asp-52通过静电相互作用可稳

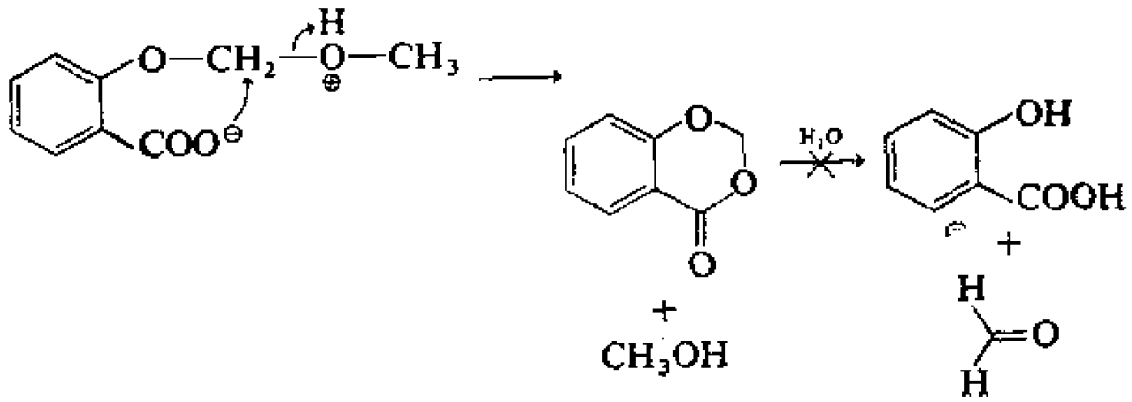


定氧碳鎓离子中间体，这些作用都可使端基碳的正电性增强。中间体采取半椅式构象，以解除由于环中引入 SP^2 过渡态而产生的张力。底物结构的这种改变可使离去基团（环E）经立体电性控制的原则而离去。

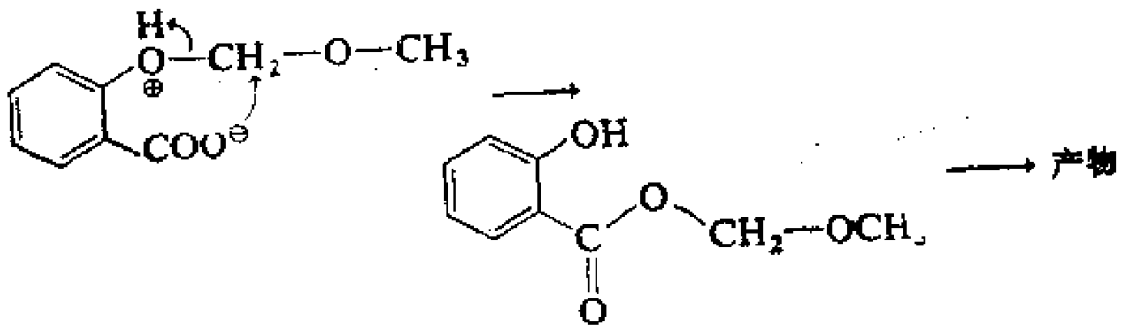
Capon等曾在缩醛类的模型化合物中研究邻位羧基对反应的影响[28]。



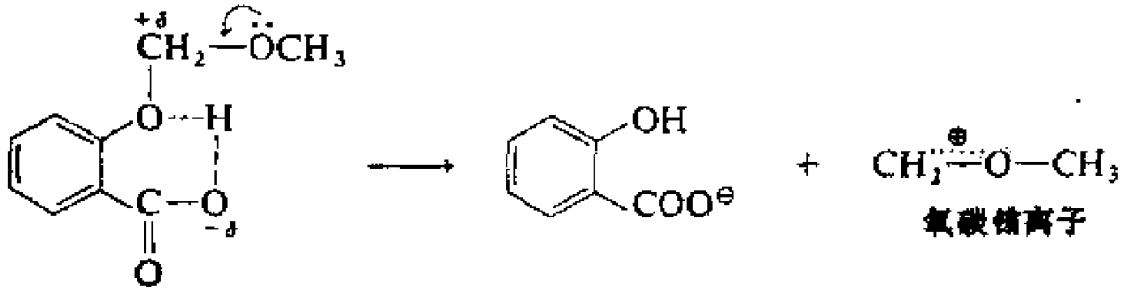
在葡萄糖苯基苷中，邻羧苯基的存在使水解反应比羧基在对位的化合物反应速度增加 10^4 倍，而对简单的芳香族醚类化合物来说，邻羧基衍生物比对位羧基化合物的水解速度增加 600 倍。其可能有以下三种分子内反应机理：两种涉及羧基阴离子的亲核进攻；另一种是分子内广义的酸催化。



由于以不同路线合成的环状中间体在反应条件下是稳定的，所以这第一种机理不发生。第二种机理相当于一个⊕ OCH_2OCH_3 迁



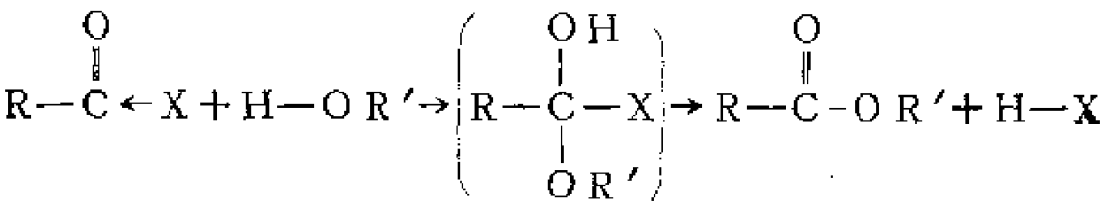
移，如果这种机理是正确的，那么在反应物和产物之间的紫外光谱中应该看到等吸光点（isosbestic points），但是实验结果并无此点。最后一种机理是最有利的，在一定程度上它模拟溶菌



素，因为羧基的行为像广义酸（Glu-35），而 CH_3O-基则与葡萄糖环上的氧原子相似。

4.5 水解反应中的立体电性控制

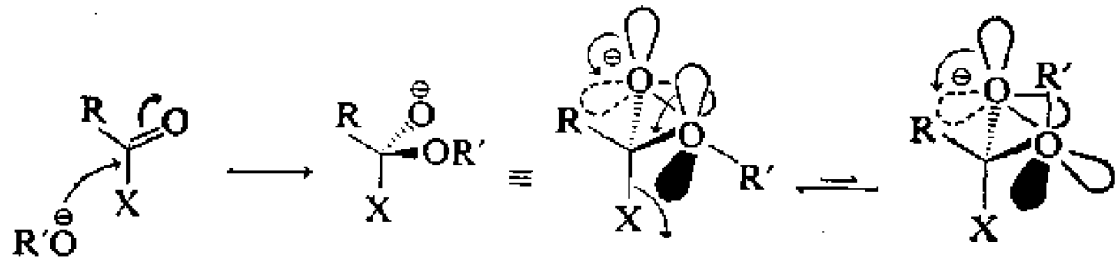
前面讨论了酶催化水解反应及缩醛的水解。现在我们需要了解在这些转化中，产物和反应物立体化学的重要性。本节将通过介绍有机化学中的新概念—“立体电性控制”来探讨此问题。这个新概念是在1971年由 Deslongchamps 开拓的[29, 30]，他应用了在水解反应中四面体中间体断裂时合宜的轨域定向性质。酯和酰胺水解公认的机理是经过四面体中间体的生成，而 Deslongchamps 则认为为了更好地理解水解反应，四面体中间体（由酯



T．I．

X=OR″或NR″₂　　R′=H或烷基

生成的半原酸酯和由酰胺得到的半原酰胺）的构象是重要的参数，四面体中间体的正确构象起着主要作用。换言之，四面体中间体的立体化学和离子状态、非键合电子对的定向，裂解和分子转动的有关能垒都是在立体电性方面控制此四面体中间体裂解中的关键参数，即四面体中间体的正确构象使其在反应中转化为产物，而且这个中间体的分解方式是由杂原子的非键合电子对的方向所控制。



X = OR″, NR_1''

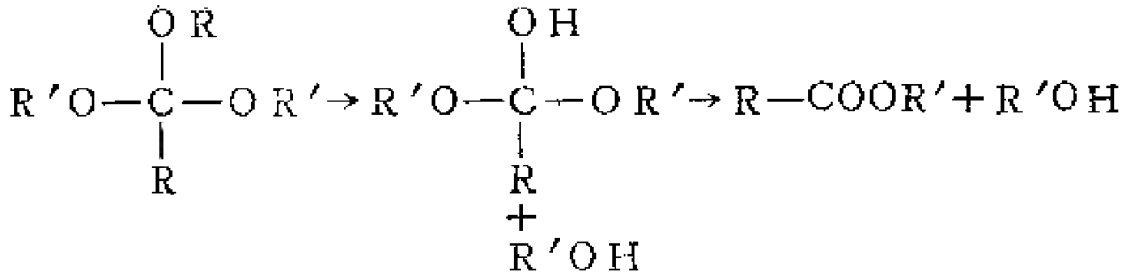
trans　　*gauche*

在以上的酯和酰胺的结构中，trans 构象（两个R基彼此远离）比起 ganche 构象来，能给出较低能量的反应途径，gauche 构象在裂解过程中不能有效地竞争。因此可以归结为：只有当中间体的两个杂原子中各有一对非键合电子，并且其方向与离去基O-烷基或N-烷基是反式共平面时，才发生酯或酰胺的裂解，即它们的裂解是受立体电性控制的。

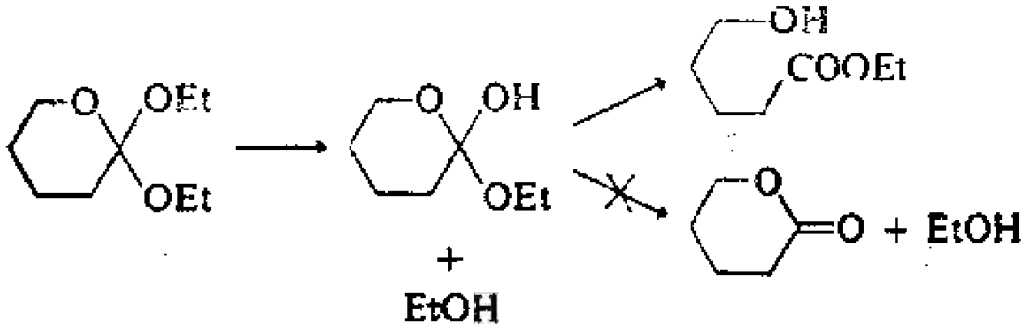
证实该假设的实验依据有四个：（1）臭氧氧化缩醛的研究，（2）酸水解环原酸酯.（3）羰基-氧交换和用^{18}O标记的酯水解，（4）N，N-二烷基化亚胺盐的碱性水解。下面以原酸酯的水解了解有关的实验依据，并介绍丝氨酸蛋白酶催化下进行酯和酰胺水解的应用。

4.5.1　原酸酯的水解

原酸酯的酸性水解，得到半原酸酯中间体，然后裂解为酯和醇。



环原酸酯的水解可写出类似的环状半原酸酯中间体。



但是环半原酸酯中间体以特定的方式分解。只得到一个羟基酯，没有内酯生成。为解释这样的结果，要检查中间体的所有可能构象。理论上环状半原酸酯四面体中间体有九个不同的 gauche 构象（见图4-5）[29]。

现要确定采用哪一个构象才可以解释水解后只生成羟基酯这唯一的产物。立体电性控制理论指出，只有当四面体中间体中除离去基团之外的另外两个氧原子各有一个轨域与此离去基团成反式共平面时，离去基团才可离去。仔细检查了每个构象体后，发现其中的五个构象体在两个乙基之间或与环的亚甲基之间有严重的1,3-顺式（Syn）共平面的相互作用，因此这五个构象体（B，D，G，H和I）可被排除。构象体C的两个氧原子没有合宜的轨域定向使第三个氧原子的 C-O 键断裂，所以也不能作为反应活性构象。其他三个构象体A、E和F没有任何强的立体相互作用，而且两个氧原子都有合宜轨域定向以断裂第三个氧原子的C-O键。按照上述合适的轨域定向规则，这三个构象体断裂时将产生

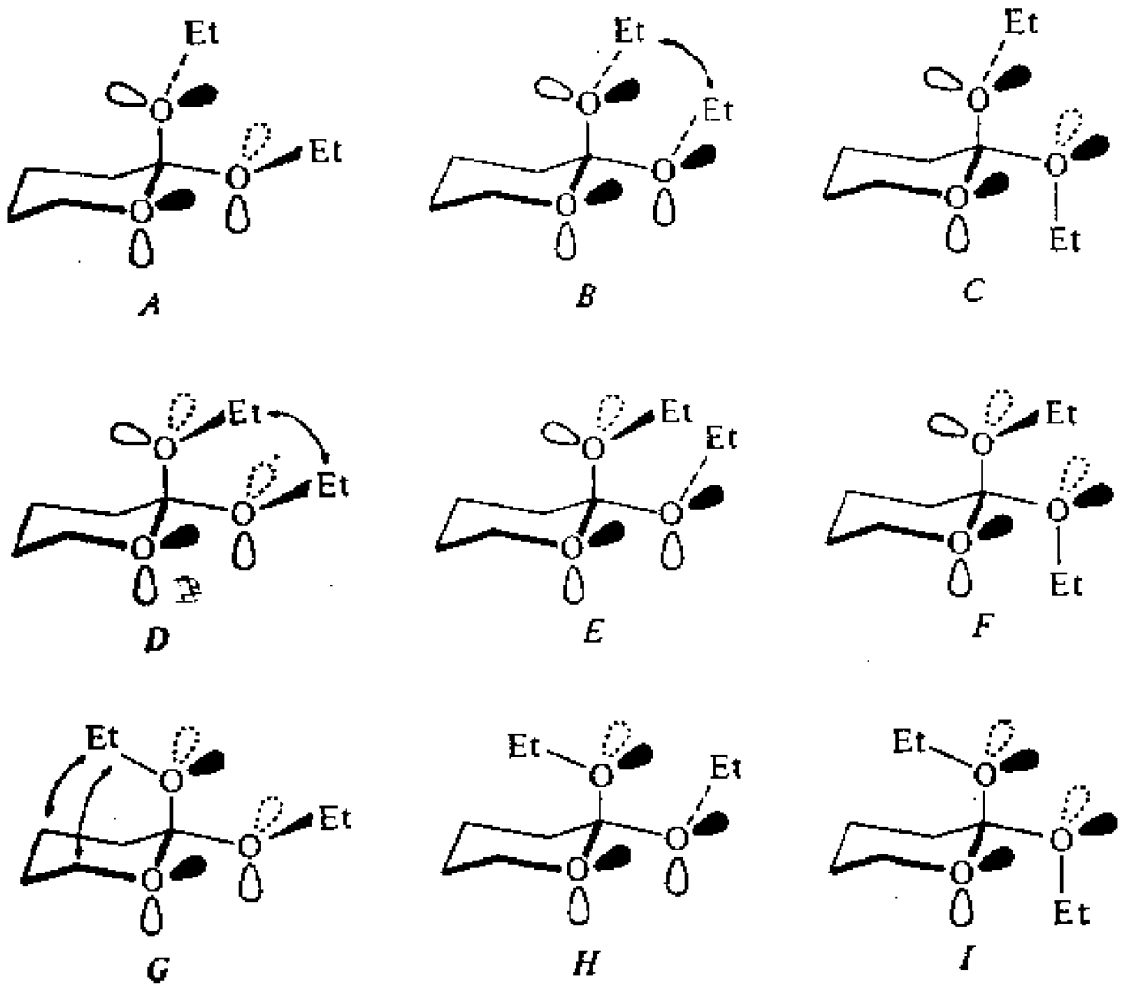
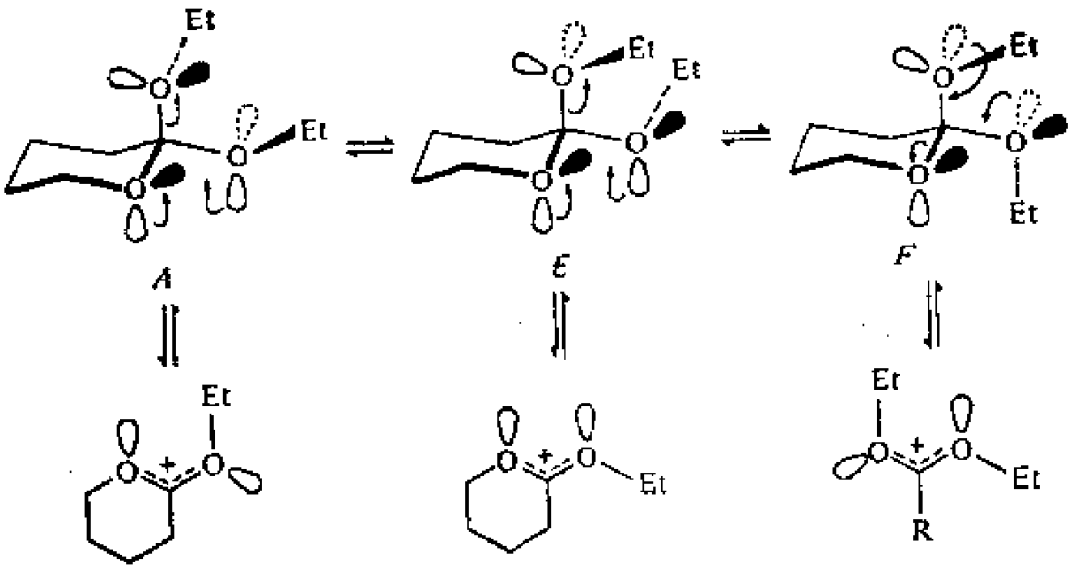


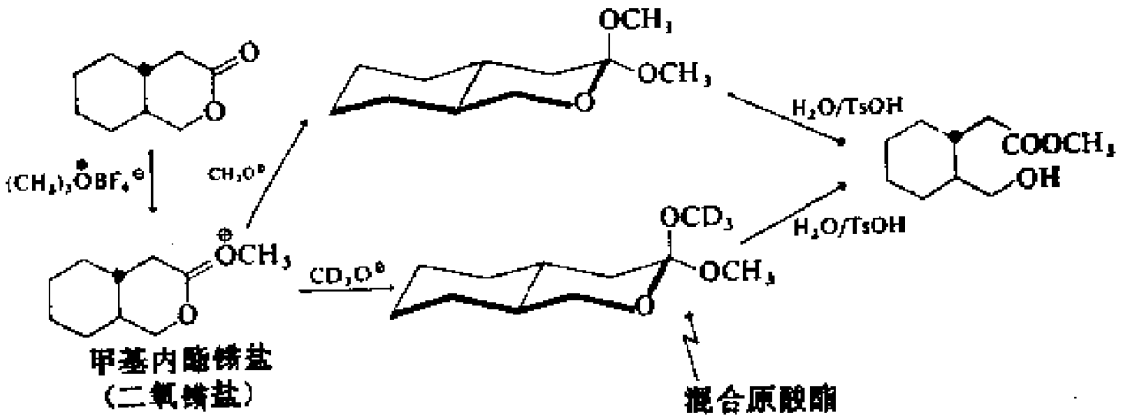
图4-5　环原酸酯的九种可能构象

相应的二氧正离子（dioxolenium ion）。让我们看看二氧正离子的相对稳定性，E的离子是顺式，而A和F所产生的离子是反式的，反式二氧正离子比顺式二氧正离子要稳定得多，因此构象体E的断裂是一个高能量过程。也可被排除。找出构象体A和F之间的区别的论据要困难些，原则上，当起始的原酸酯是环状时，生成环二氧正离子比非环的二氧正离子有利。再者，断裂构象体A时得到两个分子，而断裂构象体F只产生一个分子，熵因素也有



利于A作为反应型体。因此，水解环原酸酯是优先经过构象体A，即使它与构象体F和E处于迅速的平衡中[29]。

试验了很多几何形态上不同的缩醛、酯和亚胺盐，都一致符合这个理论。例如，由构象上刚性的二环内酯与三甲基氧正离子四氟化硼盐反应，可制备甲基内酯盐。

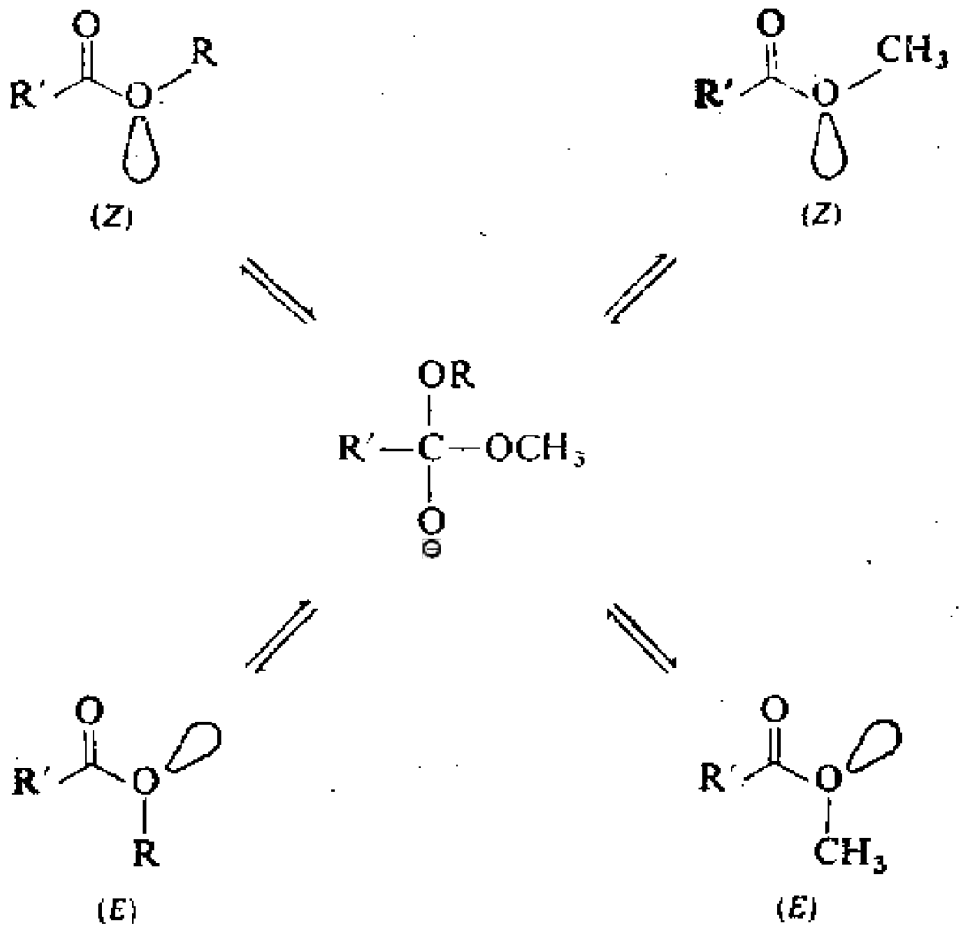


此盐在甲醇中与甲醇钠反应生成二甲氧基环原酸酯。若用氘代甲醇钠，则得到混合的环原酸酯，收率超过90%，而且氘代甲氧基在竖键方向。在含有对甲苯磺酸的水溶液中水解原酸酯，只生

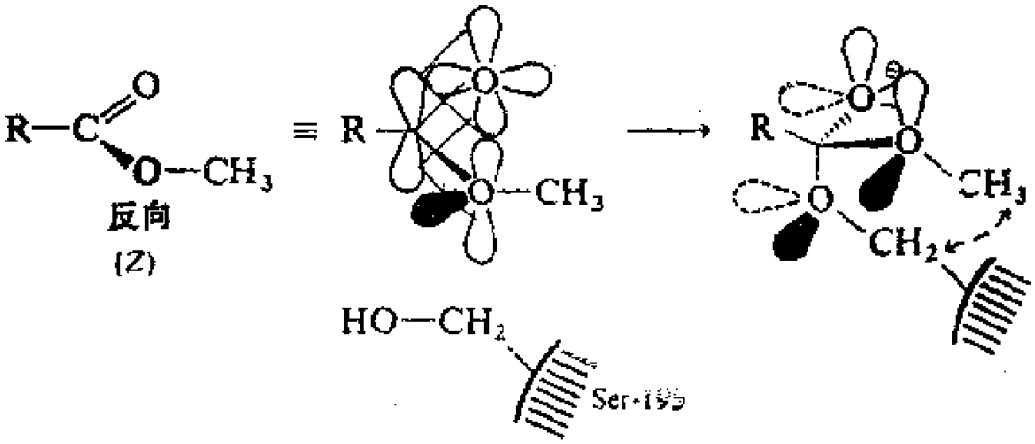
成没有氘代的羟基酯。这些结果肯定了环原酸酯水解时竖键烷氧基的丢失，并进一步证实了环二烷氧基原酸酯发生水解是经过构象体A。但此后的半缩醛（原竖键处为OH）再水解时，则经过构象体F，因为若再经构象体A，实际成为前一步的逆反应。

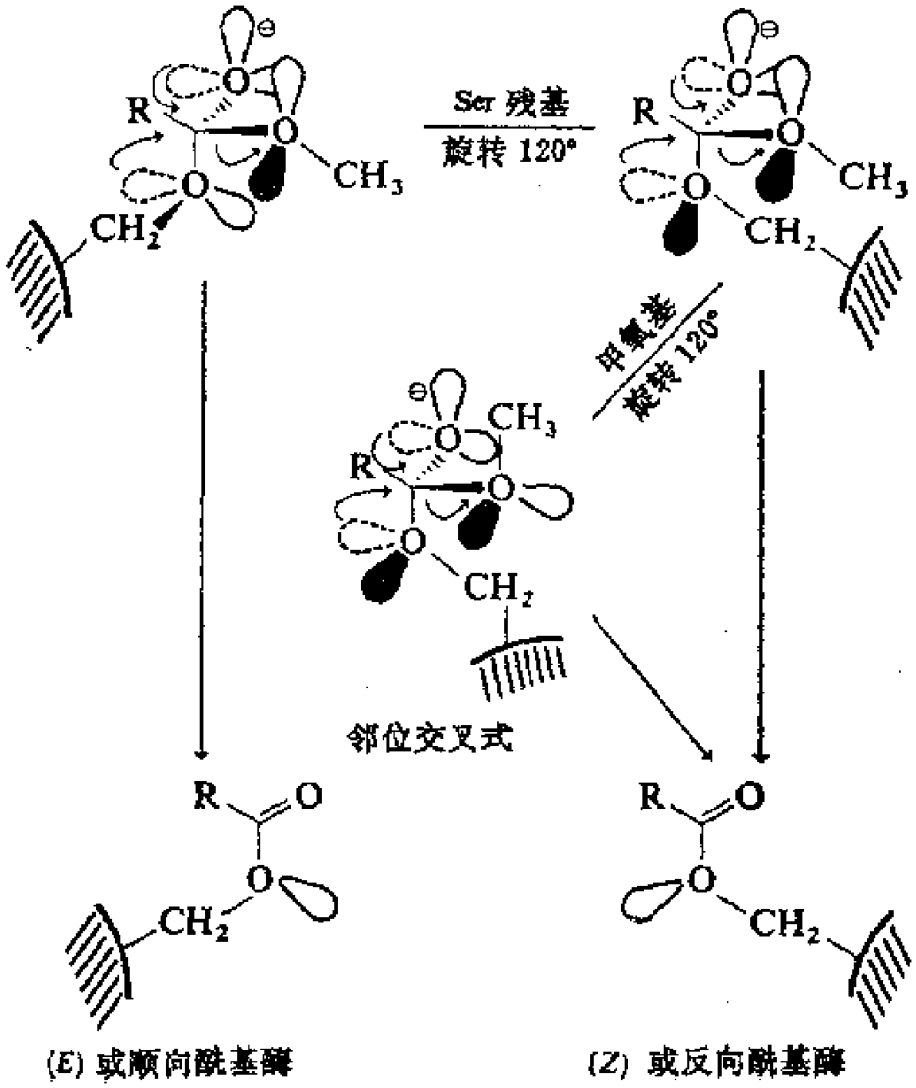
4.5.2 立体电性控制理论对丝氨酸蛋白酶的应用

Deslongchamps及其同事们建立的立体电性控制理论[31]也适用于丝氨酸蛋白酶催化的肽或酯的水解。首先从简单酯的醇解来说明。半原酸酯中间体可以裂解成两个不同的酯，它们可以是（E）构象或（Z）构象。根据微观可逆原理，由烷氧基进攻酯而产生半原酸酯也应该受立体电性控制。由于反向（Z）-酯一般比相应的顺向（E）-酯更稳定，所以通常用反向（Z）-酯来分析活性部位丝氨酸羟基的进攻，并使丝氨酸残基以远离酯底物

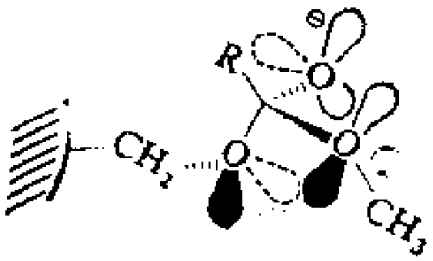


中大的R基方向接近酯。


反向
(Z)
HO—CH2
Ser-195

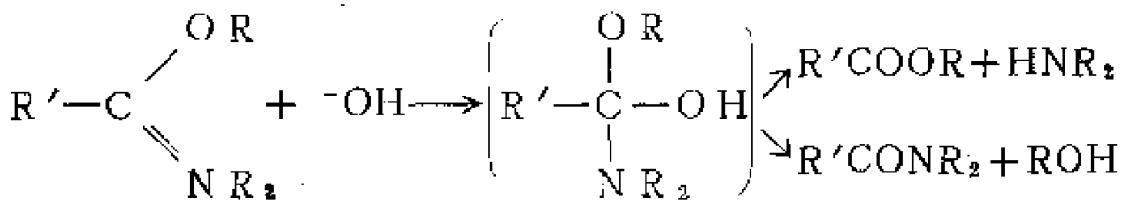

Ser 残基
旋转 120°
甲氧基
旋转 120°
邻位交叉式
(E) 或顺向酰基酶
(Z) 或反向酰基酶

然而，在这个四面体中间体中引入丝氨酸残基时，导致了严重的立体障碍（~33.4KJ）。为了减少这个张力，就必须在活性部位发生构象的改变，即围绕C-O键（四面体的碳与丝氨酸羟基连接的键）旋转 120°。新的四面体中间体将最终产生一个顺向酰基酶中间体，它是占优势的产物。另一个可能性是 $-OCH_3$ 基旋转120°，这时，甲氧基已从对R基团的反式构象改变为邻位交叉构象，这两种构象的四面体中间体在立体电性控制的原则下，$-OCH_3$ 基团离去后，都得到一个反向酰基酶中间体。第三个可能的构象由于C-OCH_3 键不能断裂，甚至在$-OCH_3$基旋转后也不能，因而被排除。

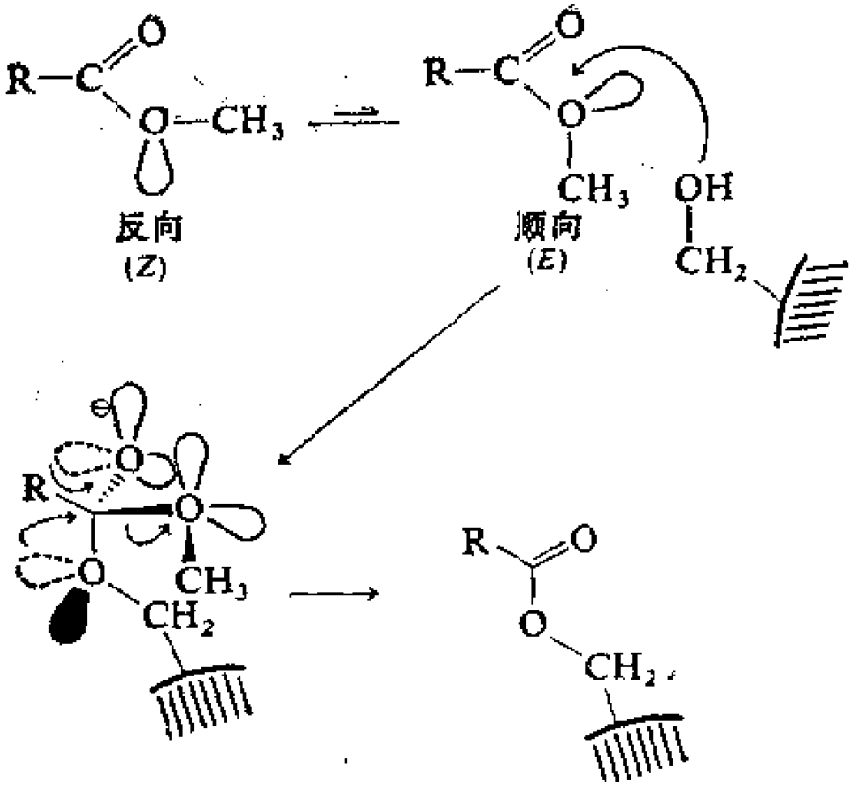


如果丝氨酸残基进攻前就发生由酶促的反向⟶顺向酯底物的异构化，这种情况的立体张力不像前面的那么严重，所得到的四面体中间体断裂后，主要生成反向酰基酶(图见下页)。

常用N，N-烷基亚胺酯的水解来理解酰胺水解机制。水解也是在立体电性控制下进行。反应时有以下两种可能的方式：放出醇或放出 R_2NH。醇或胺的排出需要在起始酰胺含有的杂原子上

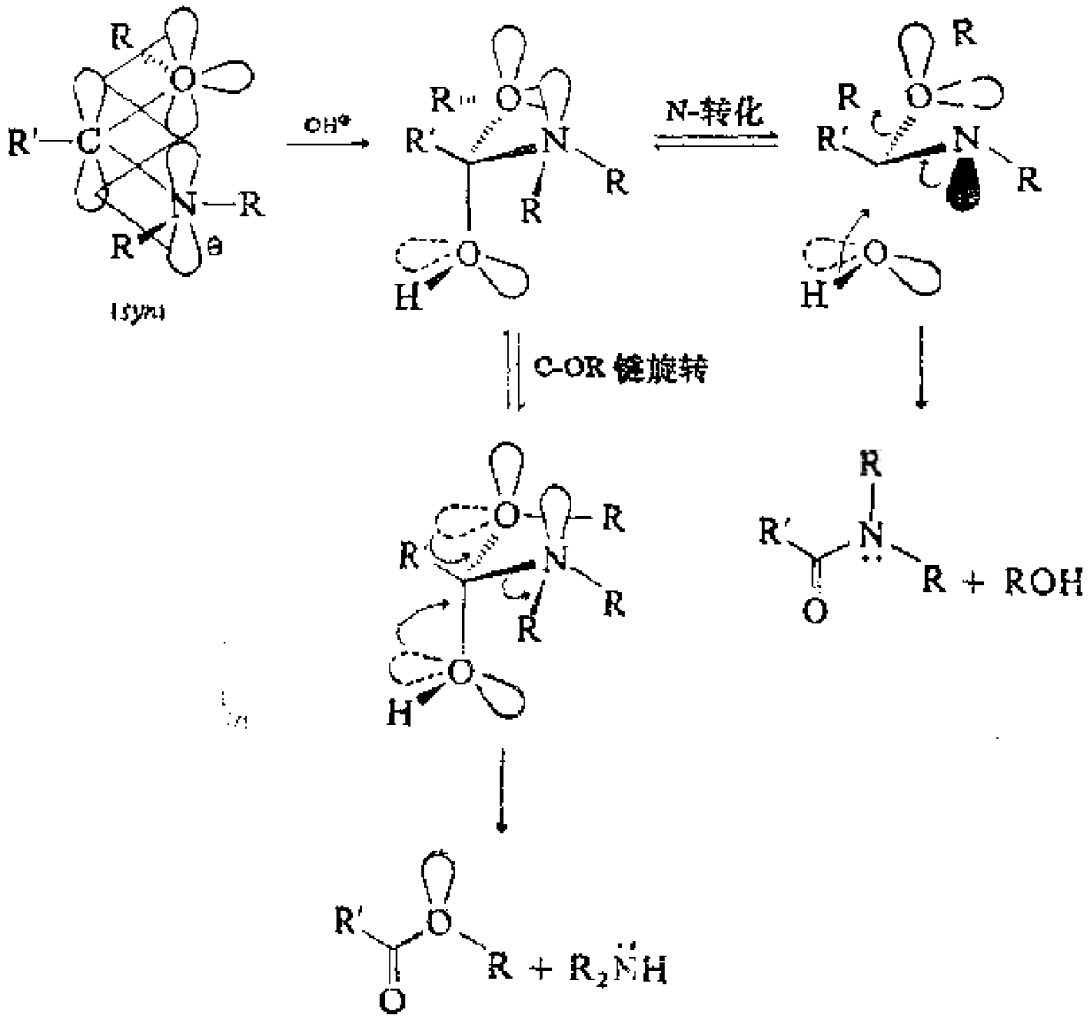


的两个反式共平面弧电子对轨域的协助下进行，如若仅有一个弧电子对可以利用，则只有当键再定向后，中间体才能很快地分解(图示见134页)。

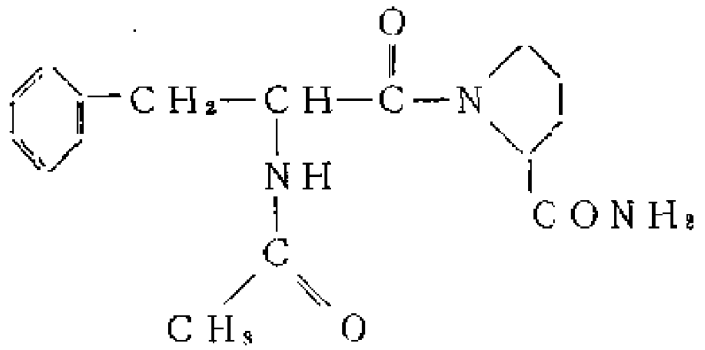


(Z) 或反向酰基酶

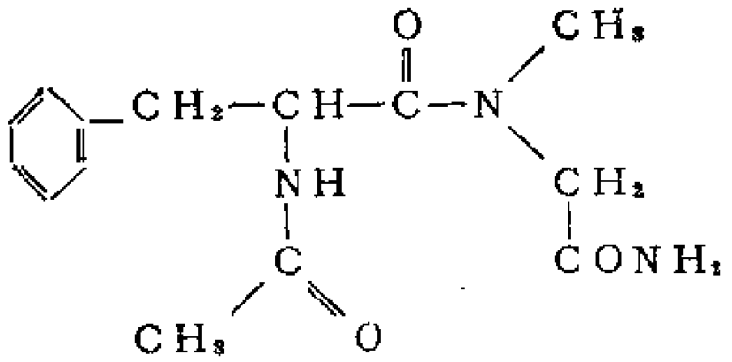
对于蛋白酶催化的酰胺键的水解，构象的改变是发生在底物四面体中间体上，还是在酶的活性部位残基上？显然，需要刚性的生物有机模型来解决这个难题。1975年 Bizzozero 和 Zweifel[32]试图解释，为什么包含有脯氨酸残基的肽链抵制 α-糜蛋白酶的作用，目的是要找到此种肽键的惰性是由于脯氨酸环上的亚甲基与酶活性部位的相互作用不利于酶-底物复合物形成，还是由于在复合物形成后键的改变一步中有立体障碍，以及此立体障碍是与脯氨酸环结构有关，还是仅仅与氨基氮的取代有关。为了回答这些问题、他们合成了二肽 N-乙酰基-L-苯丙酰-L-脯氨酰胺和N-乙酰-L-苯丙酰-甲基甘氨酰胺，并研究了这两种化合物作为α-糜蛋白酶的模型底物的行为。结果发现两个化合物都是惰性的。但证实了它们是特定底物N-Ac-L-Phe-OMe的良好竞争抑制剂，这说明了它们能形成正常稳定性的酶-底物复合物。这两个化合物的惰性的原因应该在此后键改变的一步所发生的酶



-底物相互作用的性质中去寻找。也就是说它们的惰性可能是由于转化生成四面体中间体及酰基酶时的立体电性过程引起的。



N-乙酰-L-苯丙酰脯氨酰胺



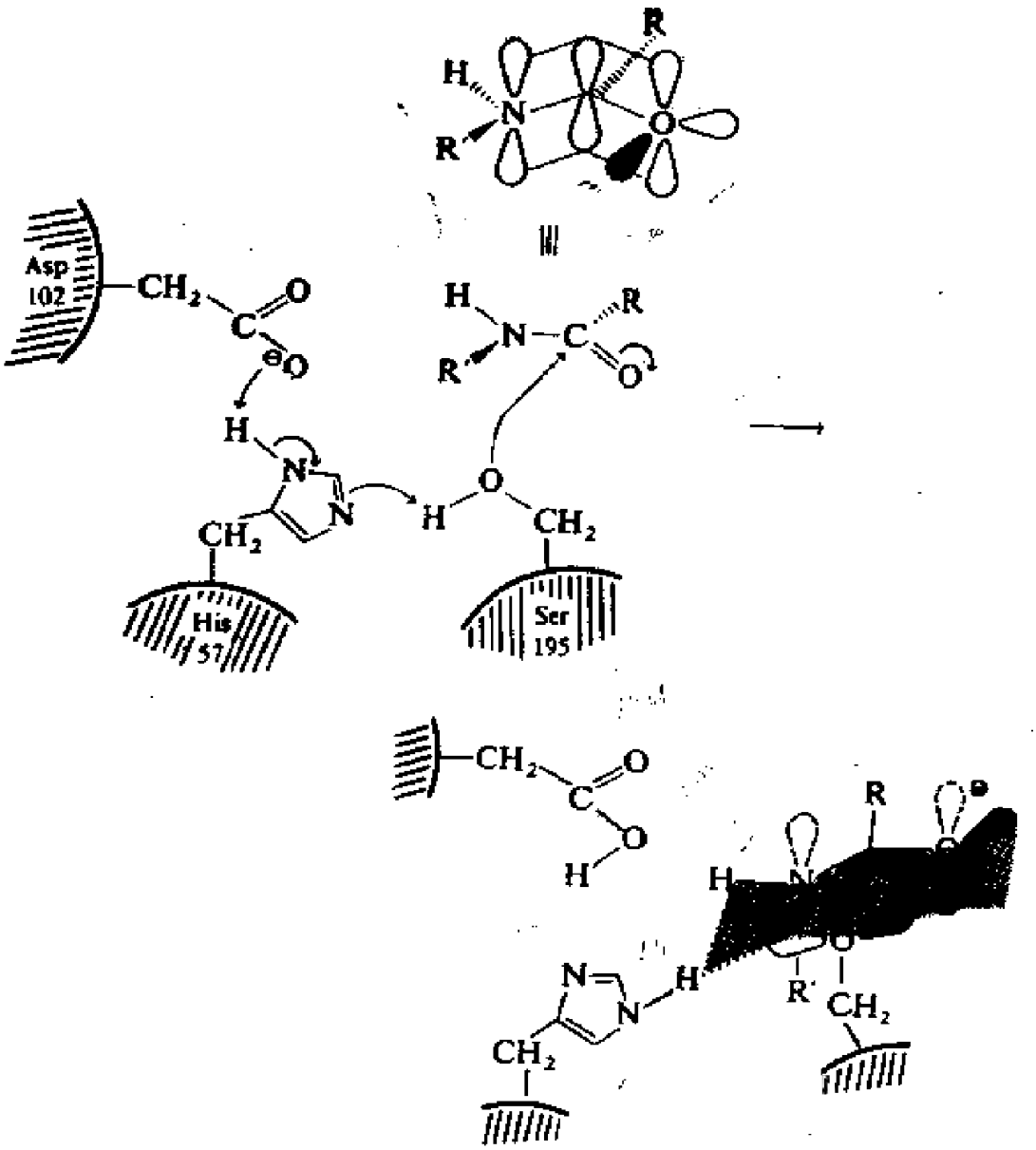
N-乙酰-L-苯丙酰-N-甲基甘氨酰胺

α-糜蛋白酶的 Ser-195 羟基进攻反式-肽键的立体位置描述如下页。

按微观可逆原理，立体电性控制理论预料杂原子的弧电子对轨域一定要与新的C-O键(由Ser-OH 和酰胺羰基形成的键）或C-N键反式共平面。这样，氮原子上的非键合电子对指向溶剂，而N-H键朝向酶活性部位的内部。为便于空间观察，把有关原子放在一个反式十氢萘的构象骨架上（阴暗部分）。当 N-H 的氢被烃基（如脯氨酸残基）取代时，则取代物与酶上 His-57 的咪唑环非常相近。由于立体障碍的缘故，阻止了四面体中间体的形成，所以含脯氨酸的二肽对 α-糜蛋白酶催化水解是惰性的。

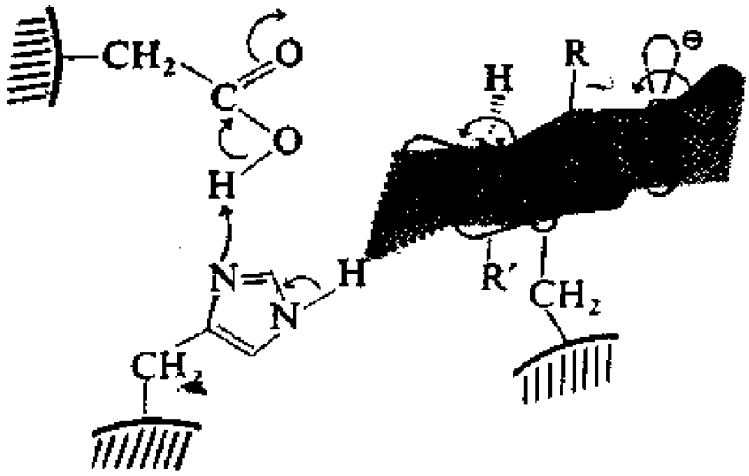
关于生成酰化酶的机理可认为是：为断裂肽键中的 C-N 键，要求氮原子先被质子化，一般认为 His-57 的咪唑是质子化试剂。但由于要离去的氮原子的非键合轨域指向错误方向（指向溶剂），而不是朝向His-57，所以上面所说的情况不能发生。为了C-N键断裂，必须使氮原子进行翻转，以便产生一个新的中间体。在新的中间体中，N-H键和非键合轨域的方向是互相交换的(图见137页)。

上面所说的氮原子翻转不仅使离去的氮原子可被 His-57 直接质子化，而且可以稳定C-O(Ser-195)键，因为此时的C-O键与N-H键而不是与非键合的电子对反式共平面，因此不易再可逆脱去。但上述构象的改变在脯氨酸残基的情况下不能发



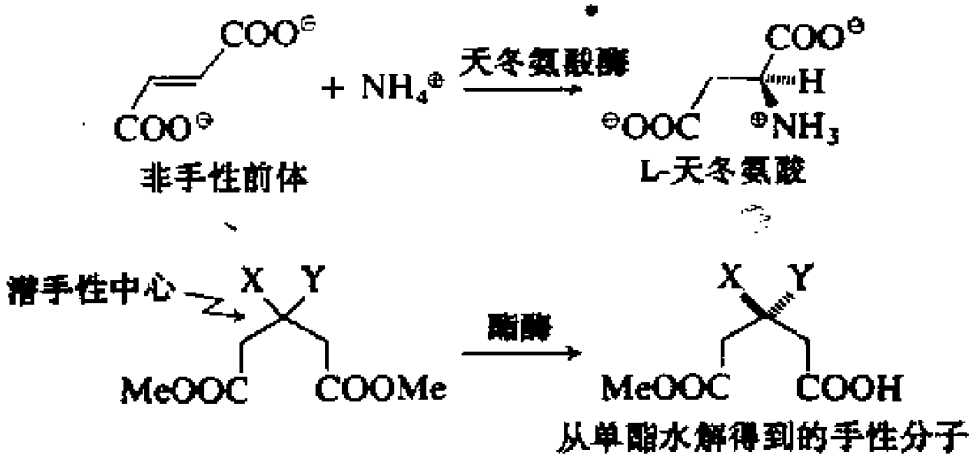
生.

1976年 W.L.Mock 建立了酰胺键的扭曲张力概念，此概念已应用于羧肽酶A的作用方式[33]。它涉及酰胺键的扭曲，致使亲核剂和在过渡态轨域上的质子或是顺式加成，或是反式加成。这个概念补充了 Deslongchamps 关于过渡态四面体的最适宜几何状态理论。



4.6 酶在合成有机化学中的应用

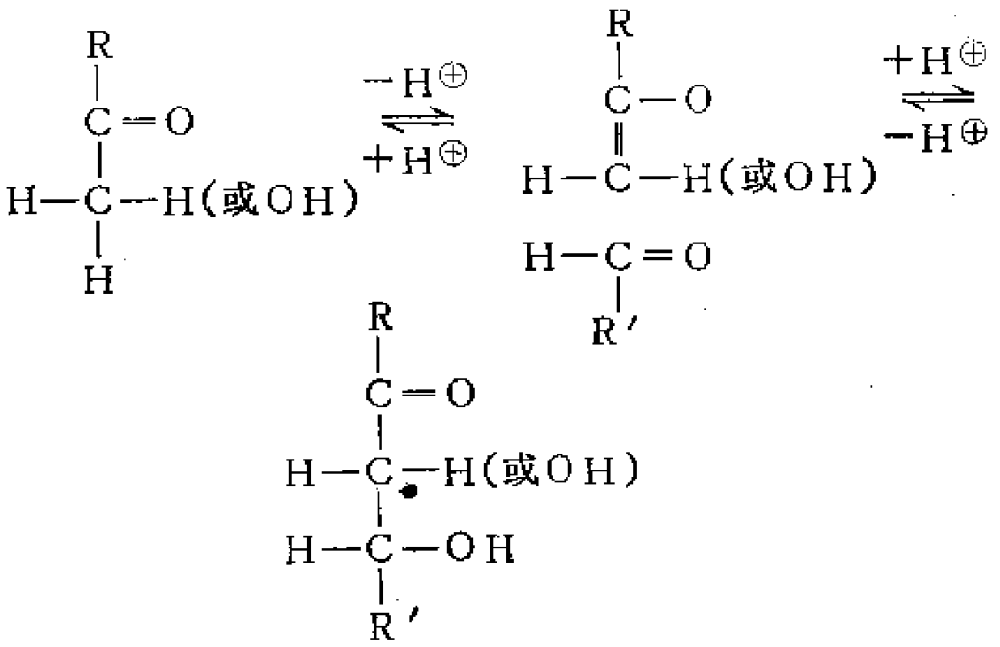
酶尚未更多地应用于有机化学中，主要原因是有些有机合成化学家缺乏对酶的通晓，因而也就缺乏这方面的动力。但是化学家越来越多地赏识酶作为选择性催化剂，在建造复杂分子的手性合成子 (chiral synthons) 方面的潜在力，所以在有机合成中，生物化学过程正逐渐地成为可以接受的路线。以下两个例子说明从非手性前体可直接得到手性分子。



在有机化学中一个与酶的应用有关的主要问题是许多底物都是“非天然物”。然而，酶可以通过改变反应条件或溶剂来改变

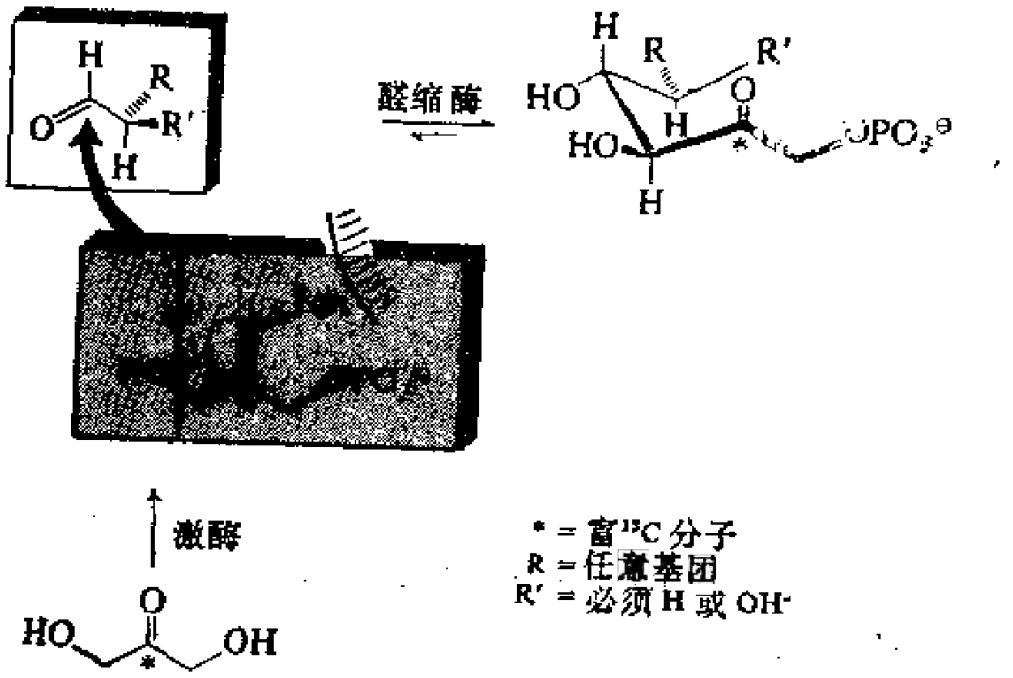
其活性，使之可以在非天然底物上作用。酶可以分为六类，每一类特定酶均已用于有机合成中。例如，(1)氧化还原酶。已用于氧化还原反应；(2)转移酶用于转移官能基团；(3)水解酶用于酯、酰胺、磷酯的水解反应；(4)裂合酶用于双键的加成；(5)异构化酶用于外消旋作用；(6)连接酶用于经ATP裂解形成化学键的情况。

对合成化学家来说，有意义的是立体专一地引入手性中心，形成新的C-C键。在生物化学中，增长和缩短有机分子碳链的一个重要和常用的方法是缩醛类型的反应。



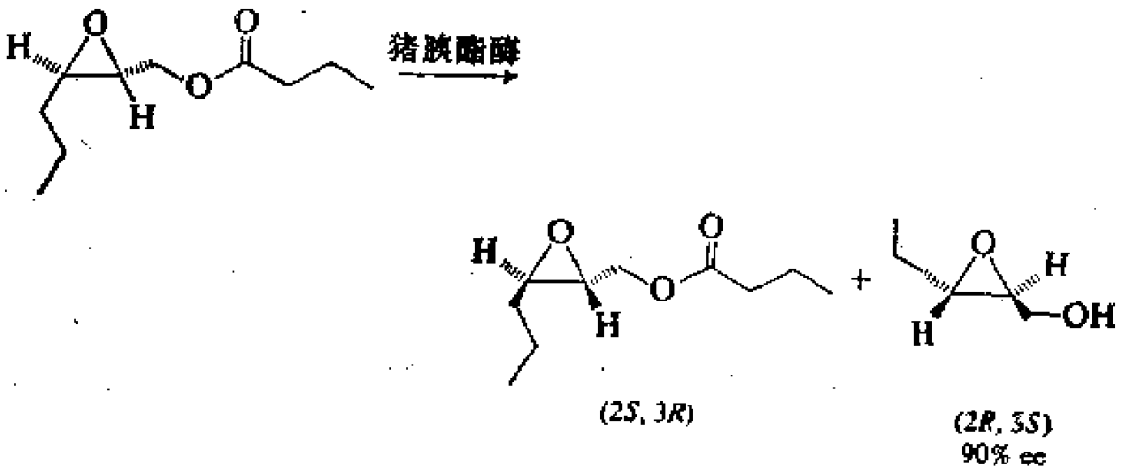
Whitesides 开拓了用醛缩酶催化的缩醛反应，合成^{13}C的葡萄糖和果糖[34]。二羟基丙酮首先被激酶磷酸化，在醛缩酶（来自兔子肌肉）存在下，该酮底物与酶的赖氨酸残基形成Schiff碱，最终得到一个烯胺中间体，中间体可作为亲核剂与一个手性醛反应。酶催化的缩醛缩合的立体化学表明，两个新的手性中心处于分子的两侧。

作为有机化学的手段，酶在药物化学、内分泌学、免疫学和生物技术等领域中将应用得越来越广泛。酶具有对外消旋底物的



对映体之间的识别能力。下面给出几个对映体专一性和前手性专一性的例子，来考察酶在这方面的识别能力。

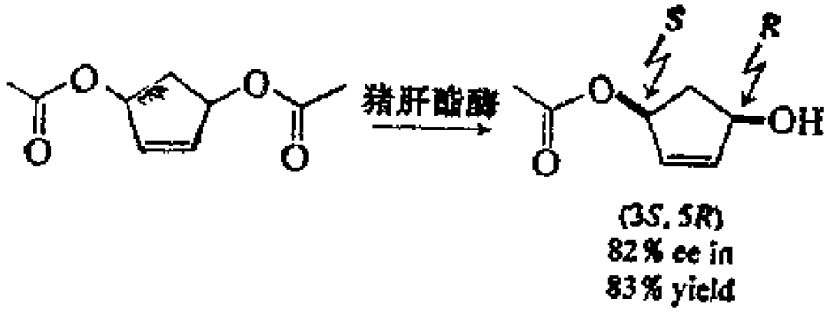
1. 外消旋环氧酯的拆解[35]选择性水解2R，3S异构体的酯键。

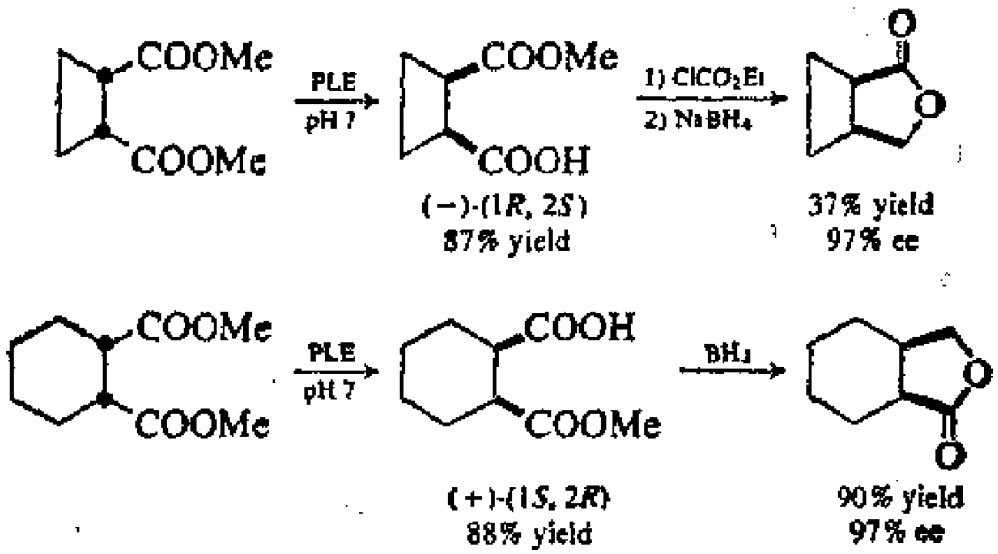


2. 前手性醇meso-二酯的水解[36](图见下页上)。

事实上，猪肝酯酶（PLE）对很多结构不同的meso-二酯底物都有选择性。例如[37](图见下页中)。

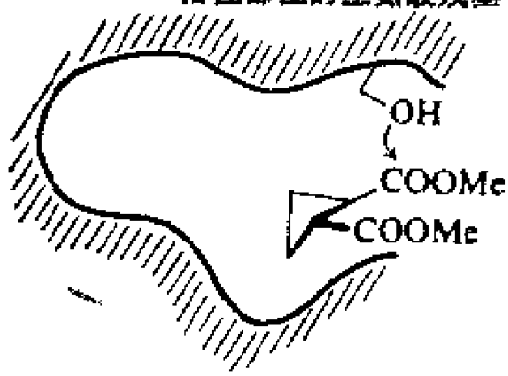
Sabbioni和Jones观察到从环丁烷(或环丙烷)二酯至环己烷



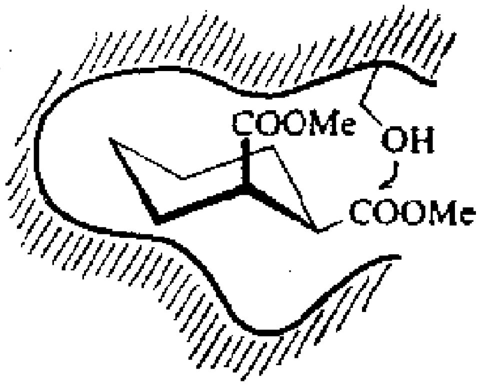


二酯底物有一个引人注目的立体专一性的改变，用类似物环戊烷二酯水解，呈现了在此系列中的转换点。他们认为酶立体专一性的颠倒，可借助于两个结合袋的活性部位模型来说明。在两种情况中，酯基都是在酶活性部位丝氨酸残基的亲核性羟基附近水解，环已烷二酯不能容纳在活性部位小的疏水区，所以只能完全结合在第二个辅助的较大部位，这样就导致唯一的R-酯水解。Jones 等已经确认丝氨酸羟基是进攻横键方向的酯基。酶的不对称催化的生物化学方式胜过其他方法，它能产生其他方法不能得到的光学纯度及高收率的双功能手性合成子。

活性部位的丝氨酸残基



带小环底物的状态



与大环底物相互作用

4.7 过渡态类似物

许多酶的底物的类似物不能被酶作用，但往往是此酶的抑制剂。这些抑制剂基本上分为两类。一类是可逆性抑制剂，它们与底物竞争结合的位置，但能很容易从酶那里除去，而使酶重新恢复活性；另一类是不可逆抑制剂，它不能从酶那里除去。因而，酶从含有抑制剂的溶液中分离出来时不再保留活性。这种情况下，酶和抑制剂之间通常是生成了共价键，也有的情况是介于两者之间，这里不作详细讨论，可参阅文献[38]。有一类较独特的可逆性抑制剂是过渡态的类似物，它们是稳定的化合物，但它们不会往下反应生成产物。由于它们的结构模拟了底物化学变化中的过渡态，根据 Pauling的关于酶的活性部位与其催化的反应的过渡态是互补的假设，因此，过渡态类似物与酶的结合力比原底物更牢固，与酶的结合常数比底物大得多[39]。

酶与底物和抑制剂的反应可简示如下：

$$\mathrm{E+S} \rightleftharpoons \underset{\text{米氏复合物}}{[\mathrm{ES}]} \rightleftharpoons \underset{\text{过渡态}}{[\mathrm{ES}]} \rightleftharpoons [\mathrm{EP}] \rightleftharpoons \mathrm{E+P}$$

$$\mathrm{+I} \Big\updownarrow$$

$$\mathrm{EI}$$

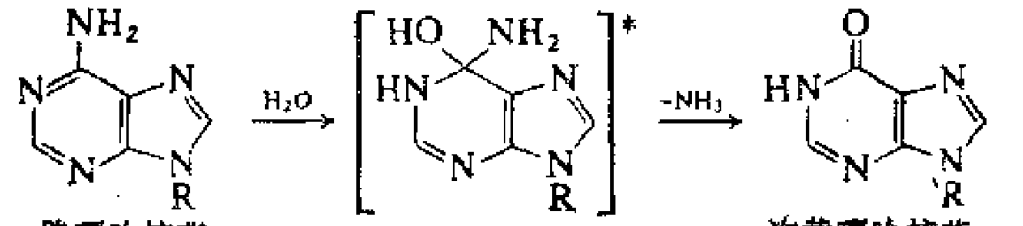
酶-抑制剂复合物

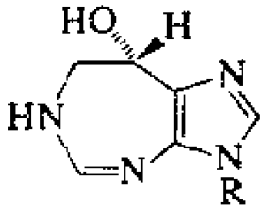
在第二章已提到，一个好的底物必须有尽可能大的Kc/Km 值，即Km要尽量小。对于一个好的抑制剂也应有尽可能小的Ki。其值为：

$$Ki=\frac{[E][I]}{[EI]}$$

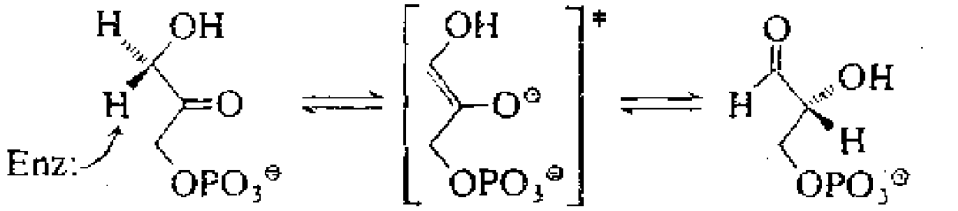
下面介绍一些过渡态类似物的例子：

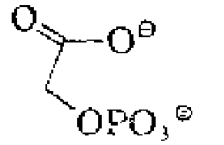
（1） 抗菌素助间型霉素（coformycin）抑制腺嘌呤核苷脱氨基酶：





反应物次黄嘌呤核苷是酶的抑制剂。但与反应过渡态类似的助间

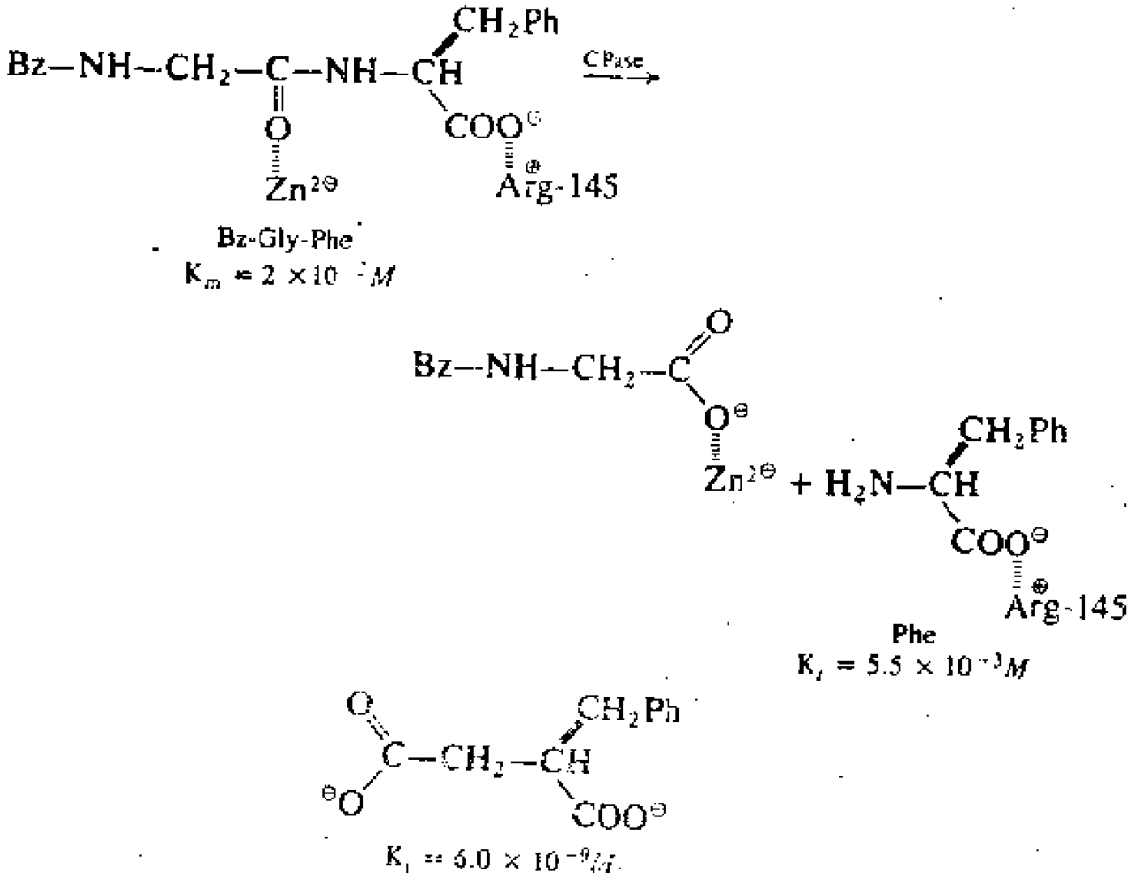




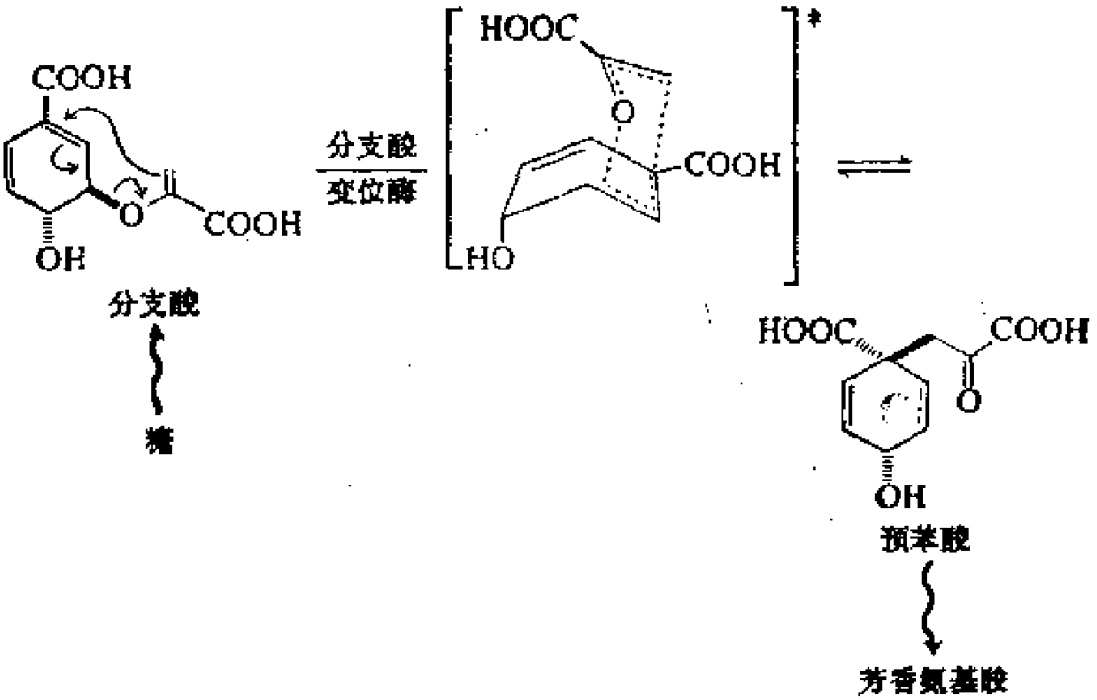
型霉素可以超出许多数量级的优势抑制此酶。

（2） 2-磷酸乙醇酸盐能阻断丙糖磷酸酯异构酶，因为它类似过渡态烯二醇盐。

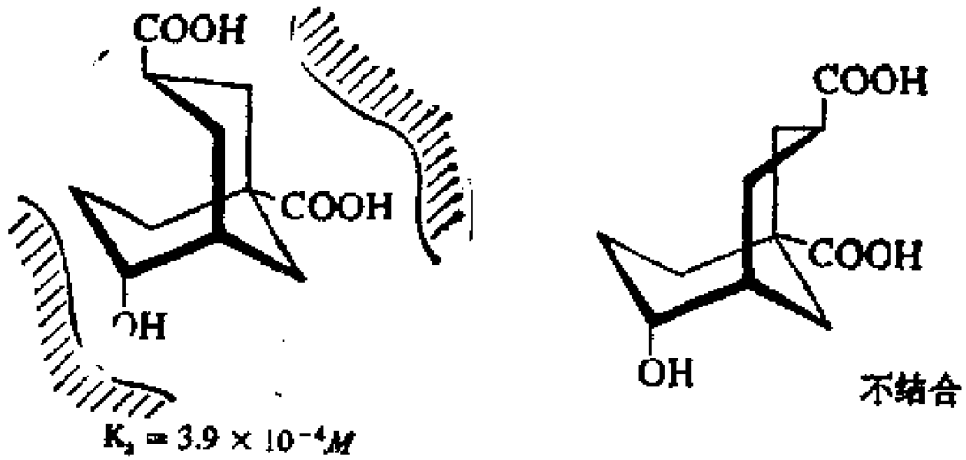
（3） 苄基琥珀酸可通过稳定羧肽酶A上的正电荷而抑制此酶活性。



在过渡态类似物设计中，一个较有意义的例子是模拟分支酸（chorismic acid）转成预苯酸（prephenic acid)的过渡态。这个特殊的生物变化是以[3,3]-同面的 Claisen 重排机理进行的[40]。这个在生物体内的分子内变化，联系了糖和芳香氨基酸之间的转化。取代的双环[3,3,1]-壬烷有可能模拟以上反应的过

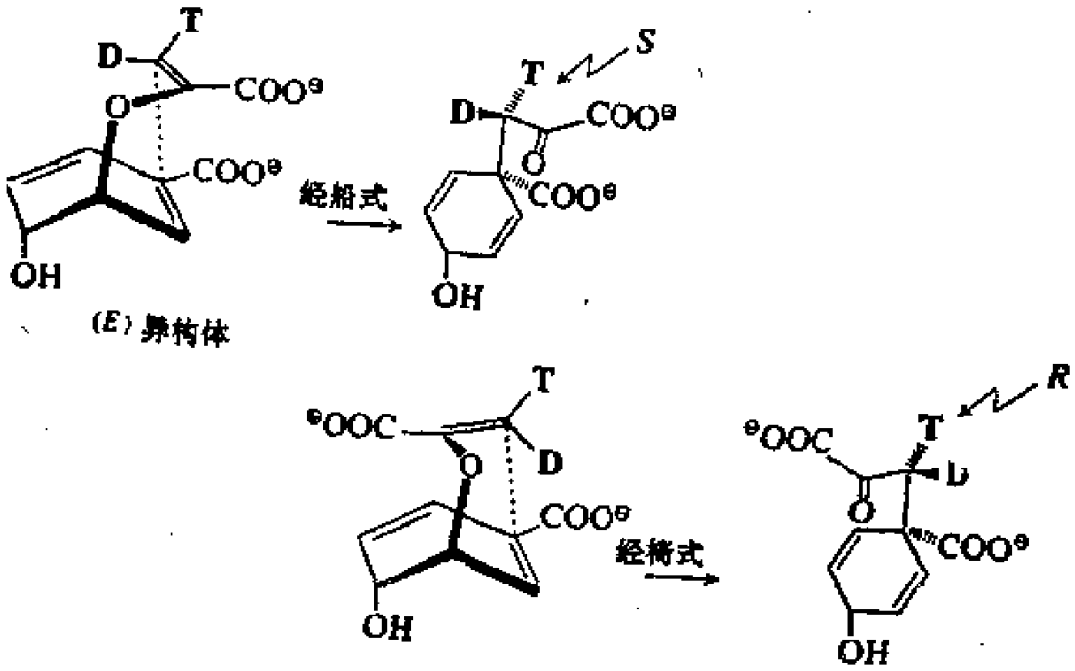


渡态，并结合到分支酸变位酶上。但是，以一个环为船式构象的异构体不能结合到酶上，这个结果不仅使人要问：过渡态究竟是以椅式还是以船式为优势构象？



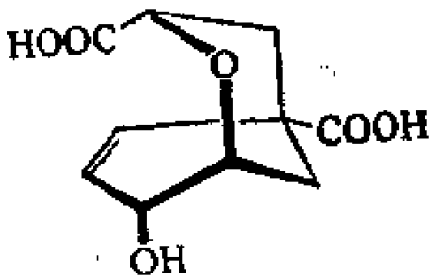
通过对标记的分支酸的反应，可以证明分支酸到预苯酸的重排反应是采取类似椅式几何状态的过渡态。反应的立体化学途径可通过分析从D和T标志的分支酸得到的预苯酸的亚甲基碳的构象来

确定。如果反应经过类似椅式的过渡态，来自(Z)〔9-^{2}H，^{3}H〕分支酸的预苯酸将有 pro-R 的T；如果反应经船式过渡态，则在pro-S位上有T。



实验结果表明，(Z)式分支酸可得到将近80%的T为pro-R的预苯酸；而(E)式异构体只有36%的T处于pro-R位置。因而证明了分子内的Claisen重排是以类似椅式的构象进行。

Bartlett和Johnson合成了更接近于上述反应过渡态的分子〔41〕。它是目前已知的最有效的分支酸变位酶的抑制剂。内型异构体采取椅式构象的四氢吡喃环。而外型异构体的抑制能力只及内型的百分之一。

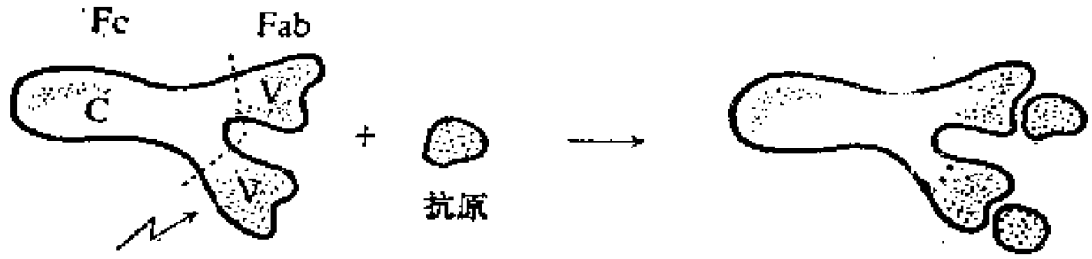


endo—isomer　Ki=4×10^{-6}M

在药物设计中，利用过渡态的类似物作为酶的抑制剂是一条重要途径[42]。

4.8 抗体酶

免疫球蛋白(immunoglobulins)是血浆中一类重要的可溶性蛋白质。它们可以作为抗体(antibodies)抵抗外来物质对人体的侵袭。抗体由四个多肽链组成（两个相同的轻链和两个相同的重链），并由二硫键相连而成。各种抗体的 N-端区域的一级序列是不同的，此区域也正是抗体与抗原结合的部位。每个抗体能结合两个抗原分子。下面以木瓜蛋白酶水解抗体时的情况来说明：



抗原一抗体结构示意图

水解得到三部分，两个 Fab（抗体结合区域）和一个 Fc（恒定区）。不同的抗体可由这三部分结构来特征。Fab 变化较大，Fc 变化不大，但在抗原的非共价分子识别时，同样有可能在这个区域引起某些结构的微扰。“V”表示可变区。

抗原可以是蛋白质，如在病毒囊表面的蛋白质，也可以是小分子，一般称之为半抗原（haptens）。与酶相似，抗体有能力识别互补的分子结构，并形成有很高结合常数的特定的复合物，但抗体是与基态分子结合，而酶是结合有较高能量的底物。

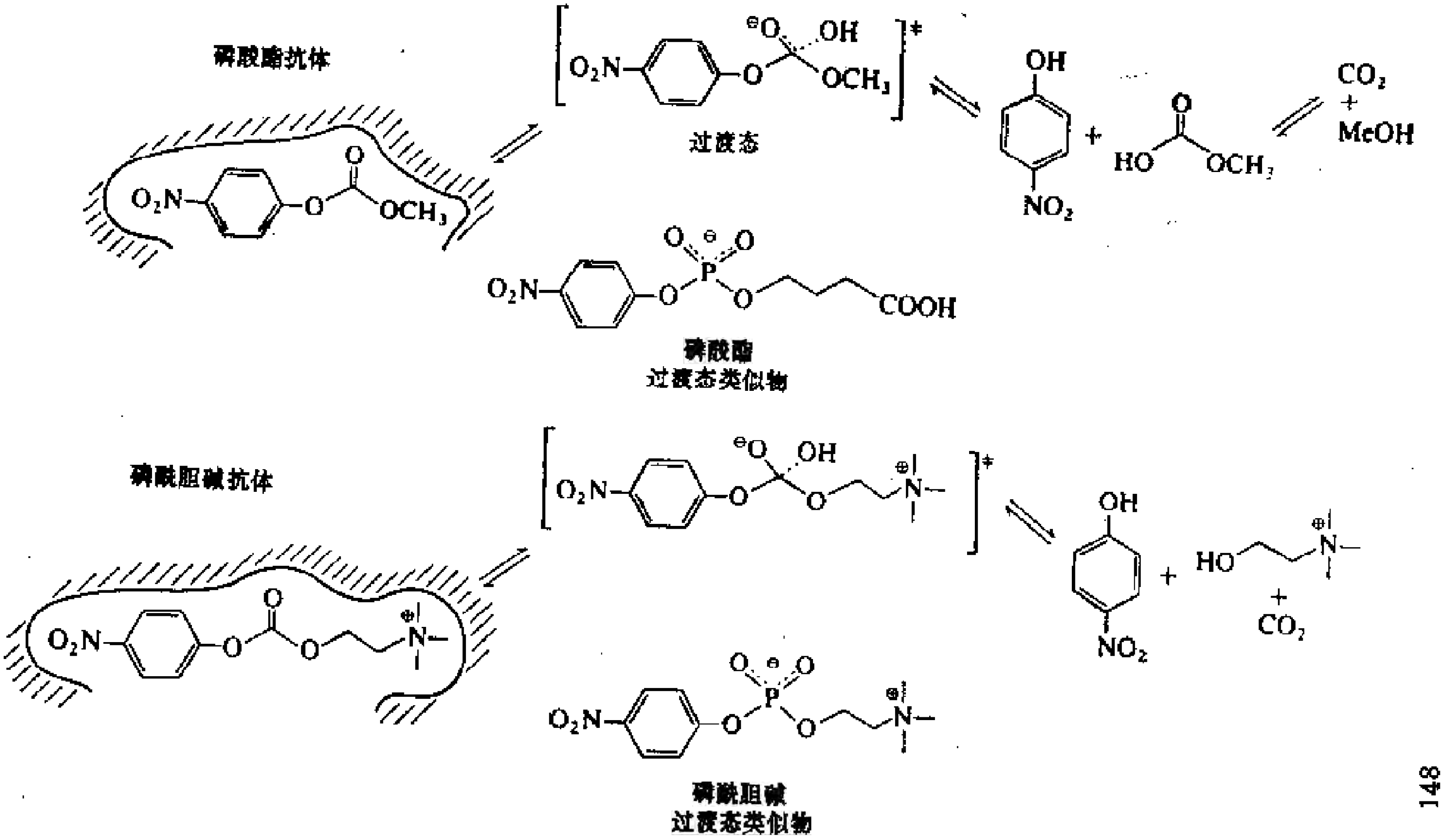
免疫化学历来是集中于抗原性和抗体-抗原之间识别方面的研究。但近年来，免疫化学有了新的发展方向，借助于反应机理

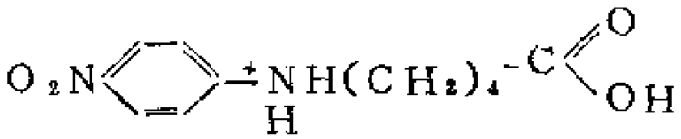
和合成化学的工作。免疫体系的细胞能够产生具有新的功能的抗体—催化抗体。由于产生的抗体具有很高的选择性和催化效率，这个新的技术已应用于生物、化学、医学各领域。同时，通过催化抗体的产生和应用，也使我们对生物催化中的一些重要的因素，如过渡态的稳定性、接近效应、广义酸碱催化剂、亲核亲电催化剂及张力等有了进一步了解。

化学领域中催化抗体的应用开始于 1986 年。当时 Schultz (43) 和 Lerner (44) 两个研究小组分别宣布获得了可专一性催化某碳酸酯和羧酸酯的抗体，他们称其为抗体酶(abzymes)。他们的设计思想就是基于上一节中提到的“过渡态类似物”的原则：在电性和立体上与过渡态类似的稳定的模拟物能牢固地结合到酶上，并显示出比原底物更强的结合能力。他们看到了抗体具有与酶相似的专一性结合抗原的特点，因而以水解反应为研究对象，以稳定的磷酸酯作为半抗原，并经间隔基与载体蛋白相连，形成抗原。经给小鼠免疫注射和单克隆的筛选技术，得到了对羧酸酯和碳酸酯有催化水解活性的抗体酶（见下页）。由此产生的抗体酶具有极高的专一性，例如，由对硝基磷酸酯产生的抗体只水解对位硝基取代的碳酸酯，而对邻位取代物无效。

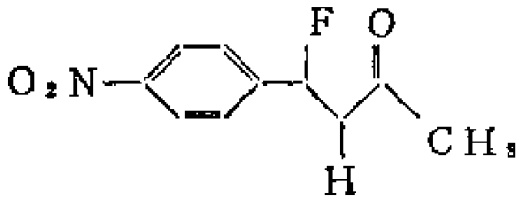
由半抗原磷酰胆碱的苯酯产生的抗体表现出饱和的动力学行为。Kcat值为0.4min^{-1}，Km值为208μml/L，这代表了其反应速率可比无抗体时加快1000倍。

设计催化抗体的基本原则是(1)利用抗体稳定正电荷或负电荷的过渡态，(2)利用抗体作为熵的陷井，以利此后熵值的改变，(3)在抗体上可引入类似酶上的催化基团和辅助因子。这方面的例子可以催化氟化物的β-消除反应加以说明[45]。

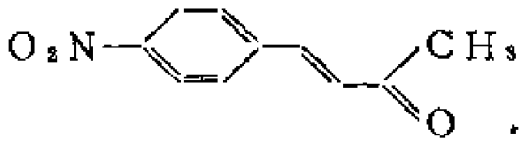

磷酸酯抗体
过渡态
磷酸酯
过渡态类似物
磷酰胆碱抗体
磷酰胆碱
过渡态类似物
O₂N
OCH₃
OH
NO₂
HO
CO₂
MeOH
COOH



半抗原



底物



产物

半抗原中正电荷 $-\overset{+}{N}-$ 所在的位置与底物中 β-氢的位置相当。这样，由此半抗原产生的抗体在相应的位置上会产生一个负电荷基团（常是离子化的酸性氨基酸侧链的羧基）。当催化抗体与底物氟化物反应时，这个负电荷基团就可起到广义碱的作用，有助于β-氢的脱除。

目前，在很多有机反应中已有催化抗体方面的研究，其中除酯的水解，β-消除外，还有酰胺键的形成和水解、内酯化、酯交换、Claisen 重排、Diels-Alder 反应、光诱导的二聚合裂解、顺反异构化反应、脱羧反应、环氧化反应和氧化反应等[46]。抗体酶在有机合成中的广泛应用，使很多过去不能进行酶促反应的合成实现了高效、专一，同时，对酰胺键的选择性水解，也对蛋白质的基因工程提供了新的策略。

李庚新

第5章 酶 模 型

酶模型是具有酶功能的有机合成分子。它比酶分子小、结构简单，因此可以尝试着用来比较直观地模拟酶的某些关键性功能。我们知道，要从生物体系内单独分析酶的催化能力中一个有关因素将十分困难，因为这必须要对酶的总催化能力中每一个组成部分都了解清楚才行。当用合适的酶模型来代替时，可以用来估计每一个催化参数的相对重要性，因为它可以将其它因素忽略不计而使之简化。所以，合成的模拟酶可以准确而巧妙地研究酶的特异性。而且可以将不同的酶模型加以合并来改善其催化功能。这种通过化学合成得到的无大分子肽链骨架的“小分子酶”含有酶所具有的活性基团、并且保持这些活性基团在酶分子的活性部位和相同的空间取向。用酶模型模拟酶的催化能力和酶对底物的选择性属于“仿生化学”领域。这种研究可以加深对于复杂的生物分子结构与其在生理功能之间的认识。当进行这种仿生研究时，应该首先了解有关酶反应的机理，例如酶的活性部位的结构、它与底物结合时所形成的复合物、酶的专一性及与底物的结合能力，酶反应中各步骤的动力学和反应的中间体组成等。

酶是一种复杂的分子，只有极少数酶的反应机理完全清楚。在酶分子的肽链上与催化能力有关的功能基常常是咪唑环、羟基、巯基、羧基及氨基等。如此众多的酶反应中，只有少数功能基有效的原因，以及如何解释酶反应的催化机理是酶模型设计时要考虑的问题。酶模型应该达到两个目的，即合理地模拟有关的酶反应机理，和导致在结构和催化机理之上予以解释。当然，从酶模型得到的信息还要进一步和所研究的酶体系进行比较，以便使二者之间尽可能一致。

一个酶模型可以不只是代表某一个酶的模式，良好的酶模型概括说来应该有下述五个标准。

1．酶模型应该具有能和底物良好地进行疏水结合的部位。因为疏水结合常常是酶体系的适应性和特异性的关键。

2．酶模型应该具有形成静电吸引力或氢键的部位，以便它能和底物以特定方式结合。

3．酶模型应该具有以特定方式相连接的催化基团，以便能有效地进行反应。

4．酶模型应该具有刚性结构，以保持它和底物间有相互适应的部位和立体化学要求。

5．理想的酶模型应该具有水溶性，并且能在正常生理条件的pH值及温度下保持催化能力。

上述酶模型的标准说明，在设计酶模型时除具备催化基团之外，还要考虑到与底物定向结合的能力。酶模型要和酶一样，能够在和底物结合过程中，通过底物的定向化、或键的扭曲及变形而提高底物基态的能量。此外，酶模型的催化基团和底物间必须具有相互匹配的立体化学特征。这对于形成良好的反应特异性和催化效力十分重要。总之，一个有效的酶模型应该具有酶的催化能力的各种特性，例如催化的选择性、服从 Michaelis-Menten（米一曼氏）方程（饱和现象）、引起反应速度的增加以及表现出双功能或多功能基的协同催化等。

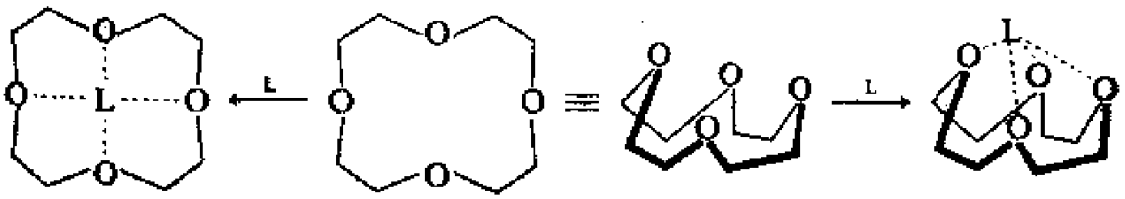
至今，所模拟的酶过程还限于水解酶。在六个曾被研究过的酶中四个是蛋白水解酶即：α-糜蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和羧肽酶。其它两个是糖苷水解酶和核酸水解酶。

本章将以人工合成的具有分辨对映体能力的有机宿主分子的化学性质入手介绍当前已经研究的几个酶模型。通过这些介绍我们会进一步认识到，对于一个人工合成的催化分子，要有效地催化反应，并且具有高度特异性最重要的原则是要有合适的电荷、氢键、疏水部位，要使它和底物之间实现分子的互补作用，必要

时可完成手性分子的分辨。此外，作为一个催化剂，很重要的是能稳定反应的过渡态，使反应沿着活化能较低的途径进行。

5.1 主-客体配位化学

1967 年 Pedersen 发现冠醚可以和金属离子或伯铵离子形成络合物的能力。此后，有机化学开辟了一个新的领域。冠醚和金属离子生成的络合物可以表示如下。12-冠-4-醚中第一个数字表示环上总原子数目，第二个数字表示杂原子数目。冠醚与配体形



12-冠-4-醚（L=配体）

成空穴络合物时，改变冠醚的环体积大小，可以改变它与不同配体的结合能力。由于冠醚可以人工合成，因此可在其结构上进行修饰，这种情形与酶对底物的识别有相似性。Cram 对于这一领域提出了“主-客体配位化学”的名词[1]。对于酶和底物的结合，早就有人用“锁和钥匙”的比喻描述。事实上，除了酶的催化和抑制作用外，络合作用在复制、基因信息的储存、修复、免疫反应和离子转移上均十分重要。因此，设计各种络合物分子结构，用来研究生命现象中的络合过程很有意义。

理想的分子络合物至少要有一个宿主和一个客体组成。宿主和客体分子均可以是有机化合物或其离子。客体常常简单一些，也可以是金属离子或金属-配体的配离子；宿主分子则要很好地设计。宿主与客体分子之间要有相对应的结合点，结合点可以是偶极的或离子型的。此外还要有互补的空间构型，即二者之间要在电性效应和主体化学方面互相匹配。胶束和环糊精是天然的宿

主。血红蛋白、叶绿素和 VB_{12} 的辅基可以结合铁、钴、镁等金属离子也属于这个范畴。图5-1列出了一些有用的合成宿主化合物。

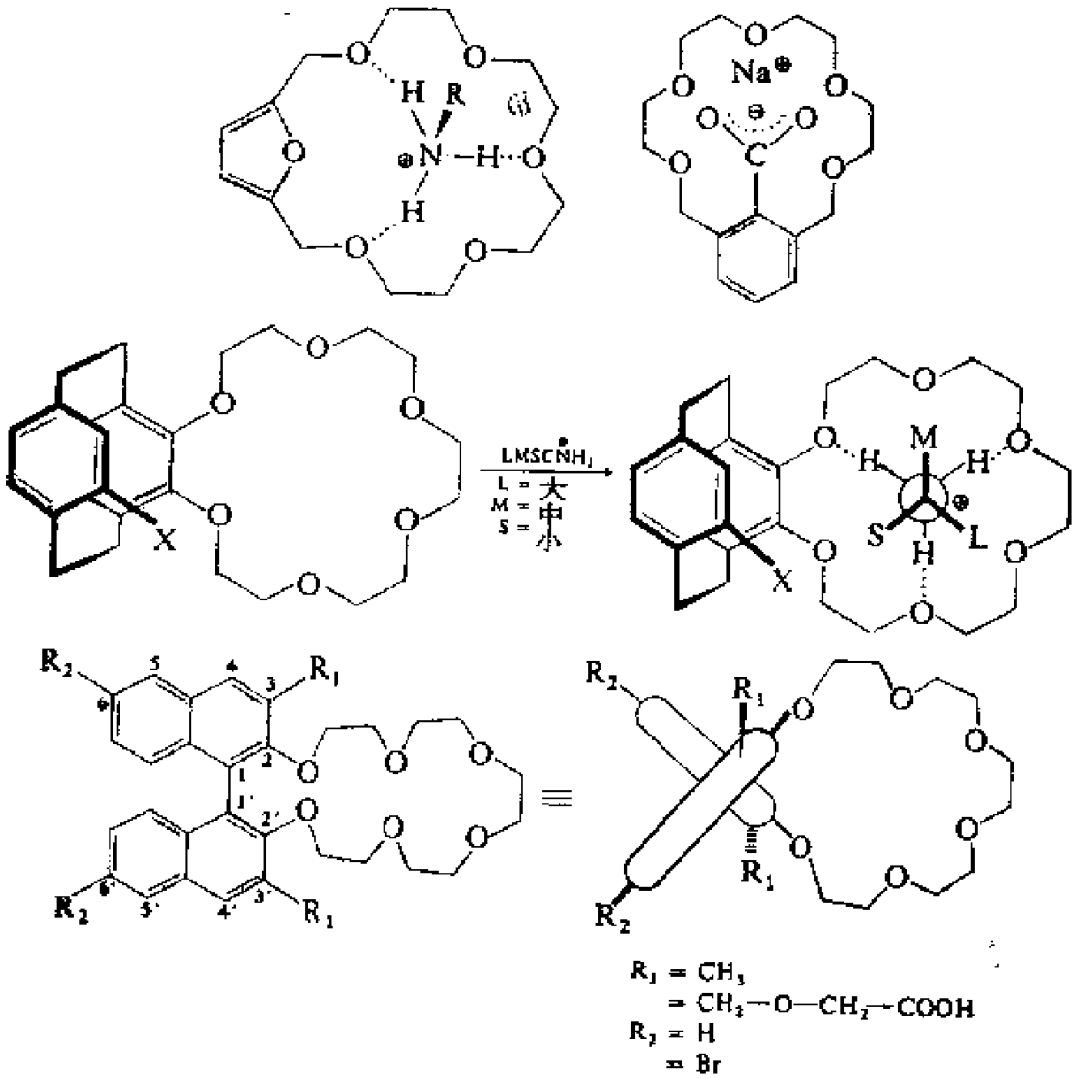
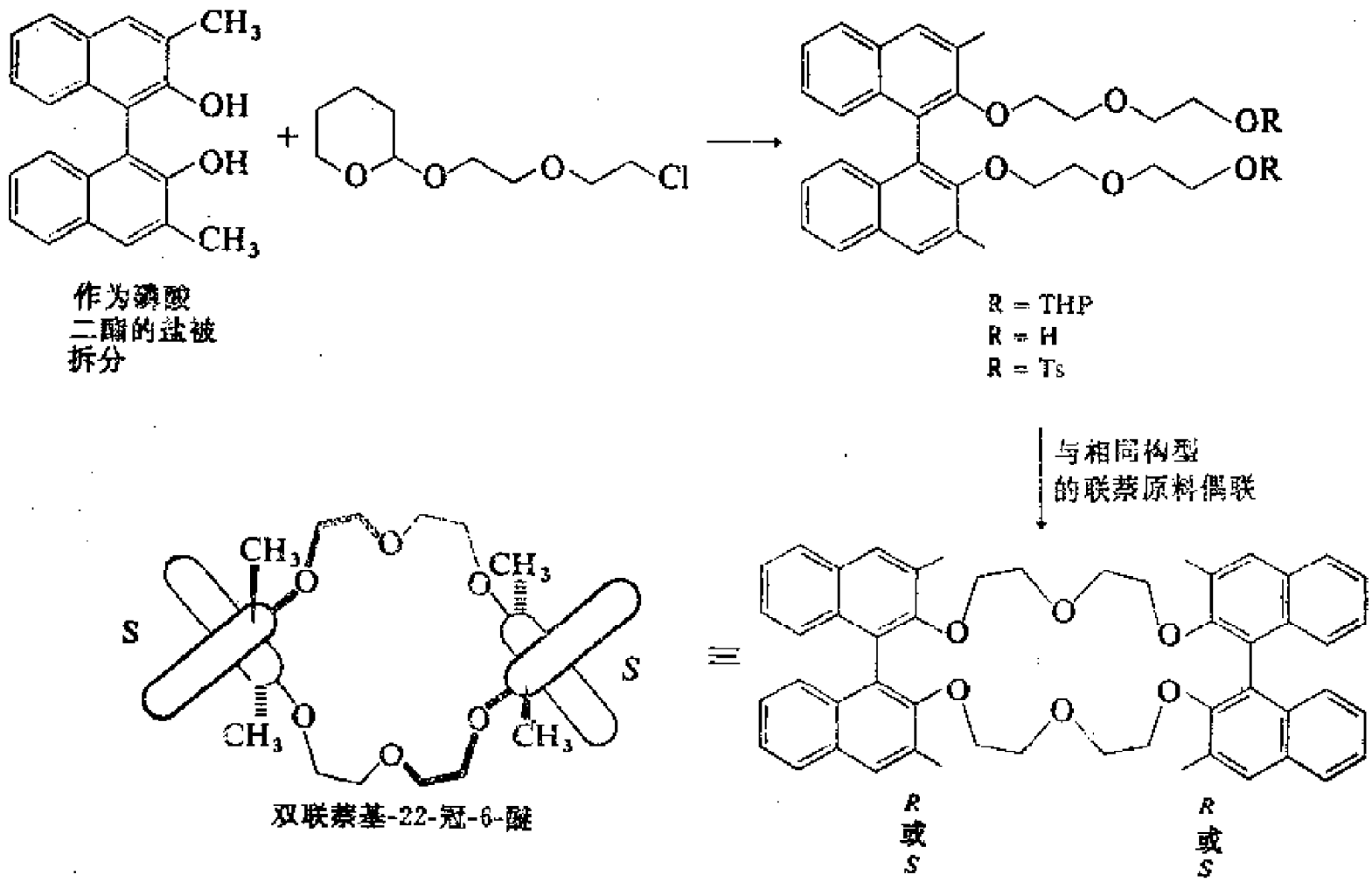


图5-1 宿主分子实例

能否使这些冠醚分子像酶一样辨别对映异构体，即拆解外消旋体呢？Cram 等人报告了有关手性冠醚可以选择地结合氨基酸衍生物的对映体之一的能力。如果用 Corey-Pauling-Koltun



双联萘基-22-冠-6-醚

图5-2　手性宿主分子的合成

（CPK）模型指导宿主分子的设计是有意义的[2]，这种模型可以说明化合物的分子空间形象。用氨基酸客体化合物的分子模型可以显示出它需要的宿主分子的空间状态、结合部位。

经过手性冠醚分子设计的多种尝试，成功地找到了把双萘环插入到冠醚分子中的结构。由于萘环增加了冠醚分子的刚性和亲脂性，这类化合物具有理想的宿主性能。图5-2说明了这些手性宿主分子的合成方法。

上述宿主分子是手性的，具有C_2旋转轴。相连的两个萘环间平面角可以在60—120°间变化。因此双萘环的引入使冠醚分子变得像螺旋一样更易扭曲。这种具有光学活性的（S，S）和（R，R）构型化合物均已合成，并且可以用来拆解消旋的伯铵盐或氨基酸酯。这样形成的非对映的络合物是一种复杂的结构，其间的区别是Cram手性识别的基础。可以利用它对酶的立体选择性的模拟。将这种手性宿主分子装入层析柱中，进行液-液色谱分离，达到外消旋体拆解的目的。当进行上述实验时，把硅胶或硅藻土放在柱内作支持剂，并且用$NaPF_6$或$LiPF_6$的水溶液饱和，把光学纯的手性宿主化合物氯仿溶液作为移动相进入柱内，再将欲拆解的消旋混合物放入柱中进行洗脱。洗脱液中的光学异构体以盐的形式出来，可用电导率来检测。图5-3表明了苯基甘氨酸甲酯的拆解结果。回收每一个纯化合物之后，经中和可得到光学活性的客体化合物。分别测定它们的比旋度，并与已知样品

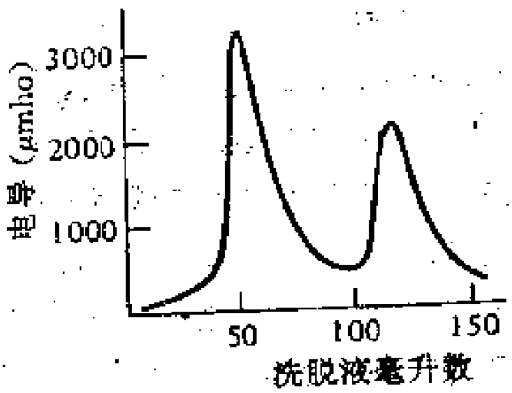
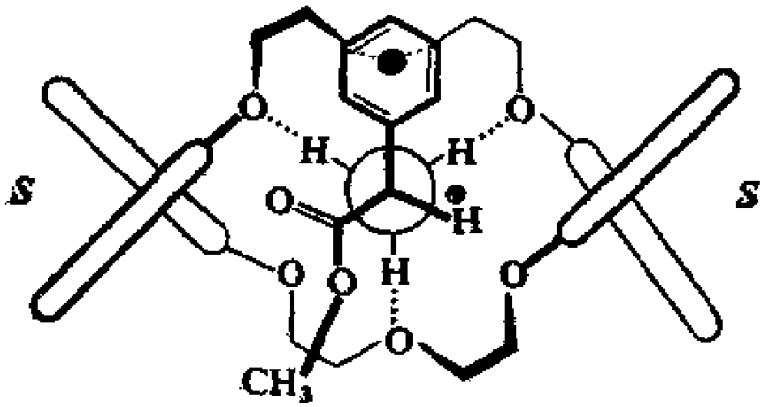


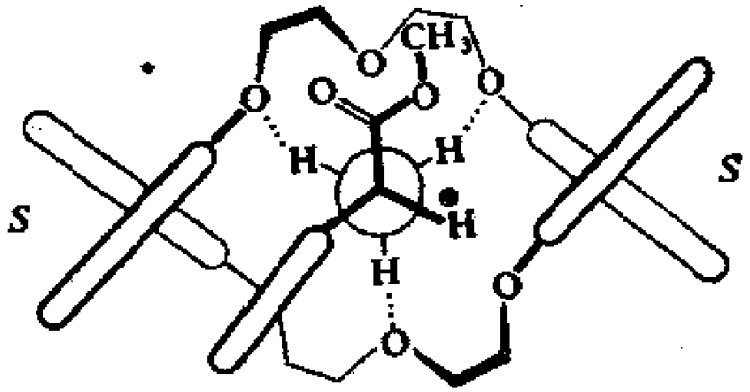
图5-3 (R，R)宿主色谱光学拆解苯基甘氨酸甲酯氟磷酸盐

对照后可确定其构型。

两个非对映的络合物结构可用相应的图形说明：



S 客体的三点结合模型

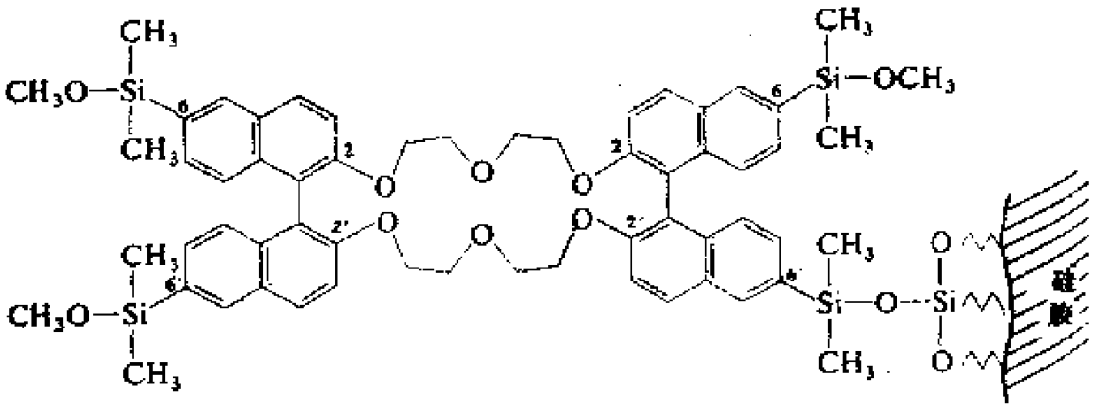


R 客体的四点结合模型

图中提到的“三点结合”或“四点结合”是表示宿主和客体间关系。这种表示方法虽过于简单但很方便实用。它能说明两个非对映光学异构体的络合物具有的结构图像。由它们的Newman投影式可显示出，在“三点结合”时，客体分子与（S，S)-宿主是通过三个N－H键的氢与大环醚上的氧原子成氢键。客体的大体积苯环与位垒(萘环)相距较远；“四点结合”时，客体的羰基碳原子和宿主的环醚氧原子之间还有偶极-偶极相互作用，因此称为“四点结合”模型。在四点结合时，客体的苯环与宿主的手性位垒重叠，位阻较大。显然，三点结合模型是立体化学上比较稳定的一个构象。如果在萘环3和3′位上各引入取代基，增大络合物的体积，则三点结合的倾向随之增大，宿主也变得更有选择

性。同样，客体分子位阻增加使络合物拥挤，也导致形成络合物时立体选择性增加。实际上，（S，S）-宿主可以优先地选择S-客体，这一对非对映异构体间的结合常数比可高达18。

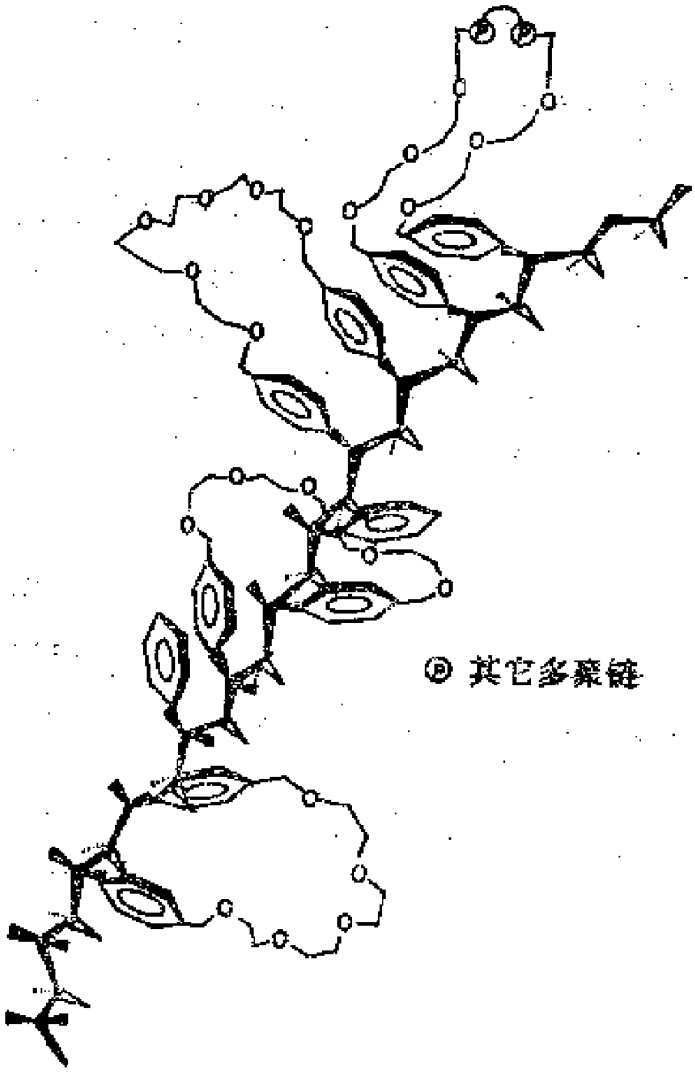
1,1-二（双萘）-22-冠醚-6体系的优点可以表现在：（1）双萘部分具有刚性，提供良好的手性异构体形成的位垒；（2）如果在萘环2,2′-位引入取代基可使结构向内聚集，在3,3′位上引入取代基则结构外伸，均可改善立体选择性；（3）当6,6′位上引入取代基时，不影响宿主和客体间络合物形成，因而可以将其连接于固相支持剂上。萘环在固相表面和宿主之间起"间隔基"



作用。将光学纯的（R，R）-宿主用这种方式固定于硅胶上，可用来进行固-液色谱拆解伯铵盐或氨基酸酯盐。这种用作对映体拆解的技术可称为对映体亲合层析（affinity chromatography）。

把合成的大环醚插入到苯乙烯和二苯乙烯共聚生成的高聚物中，可以形成对离子有高度络合能力的高聚物——聚伪冠醚[3]。它有可能生成一类有选择结合力和有效的催化剂。

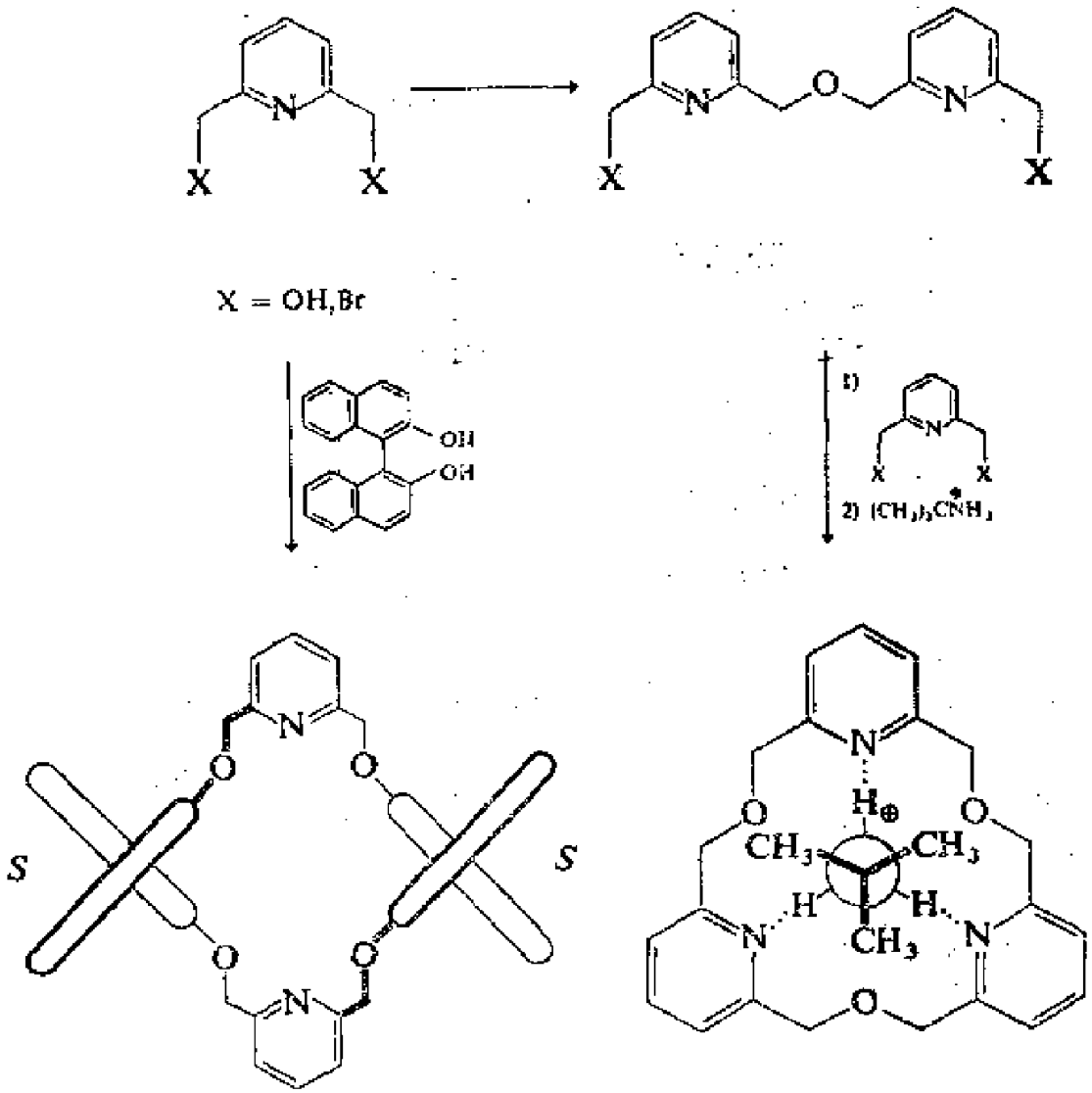
为了研究其它的络合作用结构参数，还合成了具有吡啶基的宿主化合物。由三个吡啶基形成的宿主对叔丁铵硫氰酸盐有强的络合能力。（S，S）-二吡啶基-二萘醚混合宿主可以优先结合



聚伪冠醚

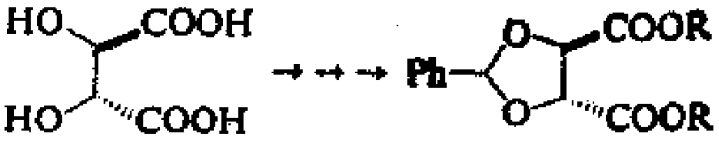
(S)-苯基甘氨酸甲酯盐。其中仍然涉及三个氢键的形成以及在N^+和O原子之间的离子偶极作用。它们对于宿主与客体间强和有效地结合起关键性作用。

Stoddart 在 1977 年利用糖的衍生物合成了新的宿主化合物。糖及其衍生物中含有双亚甲基-二氧单位，可以插入到18-冠-6-醚分子中。这种经济的手性原料可以很好地使宿主功能改善。他们还利用L-酒石酸和D-甘露醇为原料制备了一系列18-冠-6-醚。一方面可以在这些宿主分子中引入各种取代基，另一

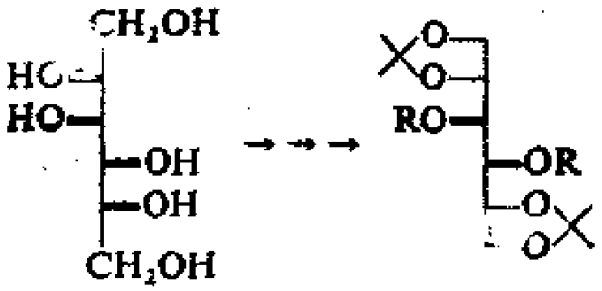


方面可形成双倍的手性中心，由4个增加为8个。

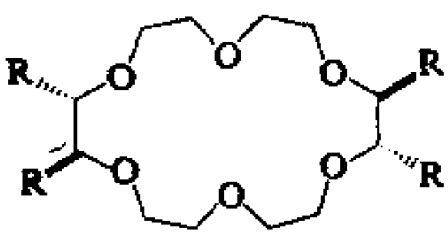
这些宿主化合物对于伯铵盐的对映异构体可以选择性地结合，此外，铵盐的阴离子性质对于络合作用也有影响。某些软阴离子如SCN^-、ClO_4^-、BF_4^-等有利于络合物形成；而硬阴离子如OH^-、Cl^-、Br^-等，因为形成稳定的铵盐，不利于宿主和客体络合物形成。上述主-客体络合化学的发展是长期以来利用“钥匙和锁”的学说制造酶类似物的例子。宿主和客体在体积、形状和电性间的匹配有助于强烈的络合作用；糖衍生物可以插入到非糖骨

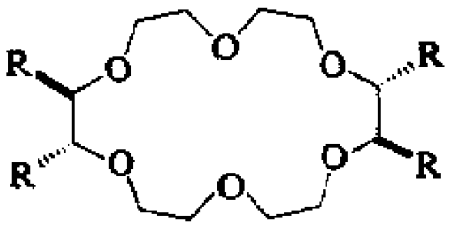


L-酒石酸

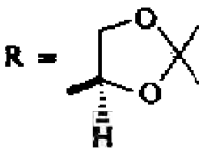


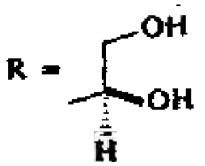
D-甘露醇　　宿主前体





R = CH_2OH
R = CH_2—$OCPh_3$
R = $CONHR_1$



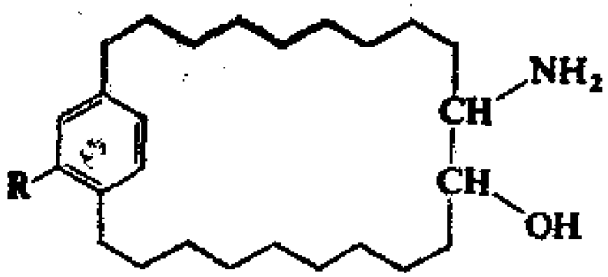


由L-酒石酸形成的(L, L)-宿主

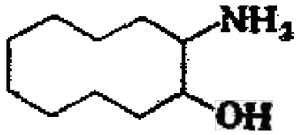
由D-甘露醇形成的(D, D)-宿主

架中，是一种天然的手性来源，这类化合物还会进一步发展[4]。

最近 Murakami 等[5]又研制了另一类大环酶模型。他们发现11-氨基-[20]-对环芳烷烃-10-醇在催化碳酸的对硝基苯酯的脱酰化反应中比2-氨基环癸醇的速度大 1000 倍。上述结果说明大环分子必须提供足够的疏水性。环癸醇体积还不足以将底物



〔20〕-对环芳烷烃
(paracyclophane)



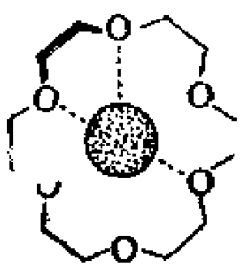
2-氨基环癸醇

酯分子结合至穴内。当然，环上功能基的空间构型应有利于络合物底物上的酯基进行伪分子内的脱酰化反应。

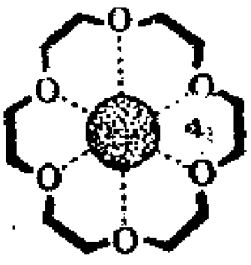
5.1.1 大环和穴状化合物的效应

Pederson 对于冠醚的研究使得化学家无需只依赖天然物实现大分子化合物对于小分子或离子的选择性识别和络合作用。由于可以改变冠醚环体积而优先结合不同半径的某些金属离子，因此，冠醚已被用作相转移催化剂，将金属离子从水相转移、溶解于有机溶剂中。此外，冠醚也被生物学家用于认识离子在生物体系内跨过磷脂细胞膜的过程。

Lehn 等又从三度空间设计了一些含有杂原子的多环化合物。由于它可形成一种立体的空穴，因此称之为穴状配体，相应的络合物叫穴状化合物。聚醚也能螯合离子，不过对于相同的金



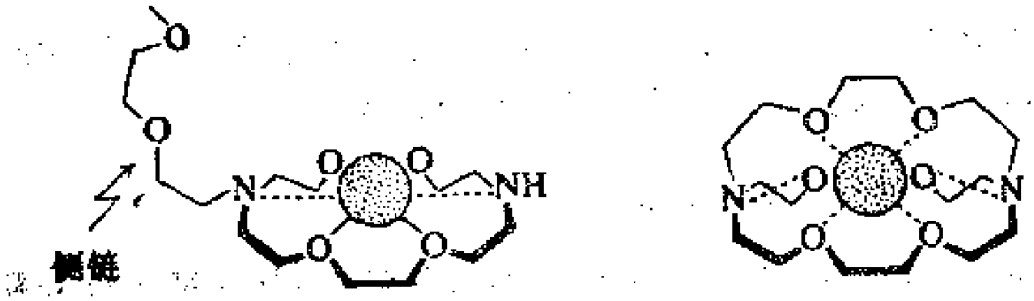
聚醚
模板或螯合效应



冠醚
大环效应

* 对于K^+在甲醇中的结合常数比1:10⁴

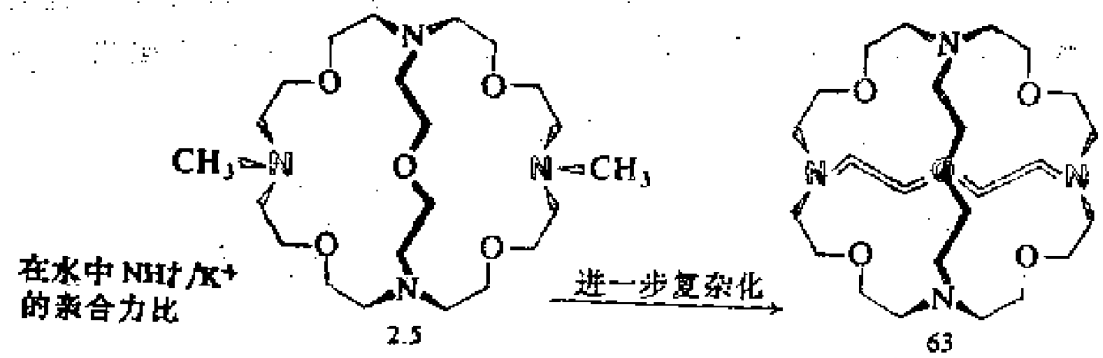
属离子来说，同样氧原子数目的冠醚要比聚醚的结合常数高许多倍。这说明冠醚络合物稳定度较大。上述大环效应与熵的变化有关，当然螯合现象也会降低体系的自由能。对于某些氮杂冠醚或带有侧链的类似物也进行了研究。下述氮杂双环冠醚与K^+生成稳定的络合物，它比带有一个侧链的相应氮杂冠醚要具有更大的稳定度。这就是穴状化合物效应。这种大环双环的穴状效应比较相应的大环效应要大。比较不同体积的穴状配体与各种金属离子的络合能力，穴状化合物也有较大的选择度。



氮杂冠醚　　穴状化合物

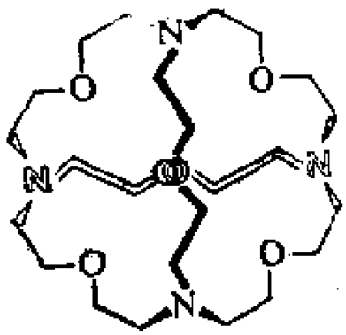
对于K^+在甲醇中的结合常数比是1:10⁸

穴状配体也能和NH_4^+结合，不过与NH_4^+的络合作用由于氢键存在而比较复杂。用一些同等体积的双环和三环化合物比较其对于NH_4^+和K^+的亲合能力时可以发现，随着分子结构的组合和对称化，对NH_4^+的结合选择性明显地增加。带有亲水外轮廓链的



双环
穴状配体

三环
疏水链穴状配体
"载体"

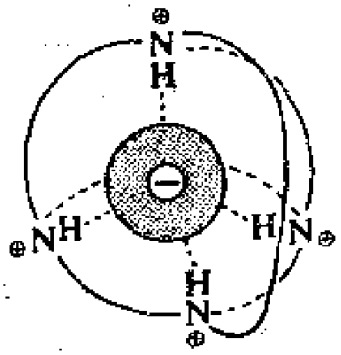


500

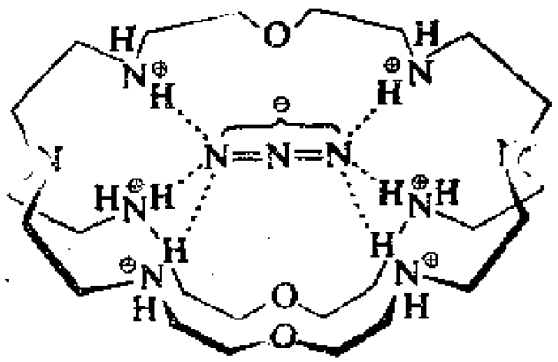
三环亲水链穴状配体"受体"

三环笼状分子则是NH_4^+的良好受体。具有疏水链的类似结构与离子络合后又易于解离，此时只能成为离子载体。因此，这对于设计特异性的离子受体或载体时十分重要。

上述氮杂三环冠醚，由于具有指向空穴内部的氮原子，可在酸性条件下质子化而成为带有正电荷的穴状季铵盐。这样它就可以与氯离子结合，结果把一个阳离子受体转化为阴离子受体。这已为^{35}Cl NMR研究证实[6]。质子化的穴状配体具有识别及结合阴离子的灵敏性，例如下述一个伸长的穴状配体可以容纳线状叠氮离子。



三环穴状化合物在受体化学中用来设计识别四面体的分子

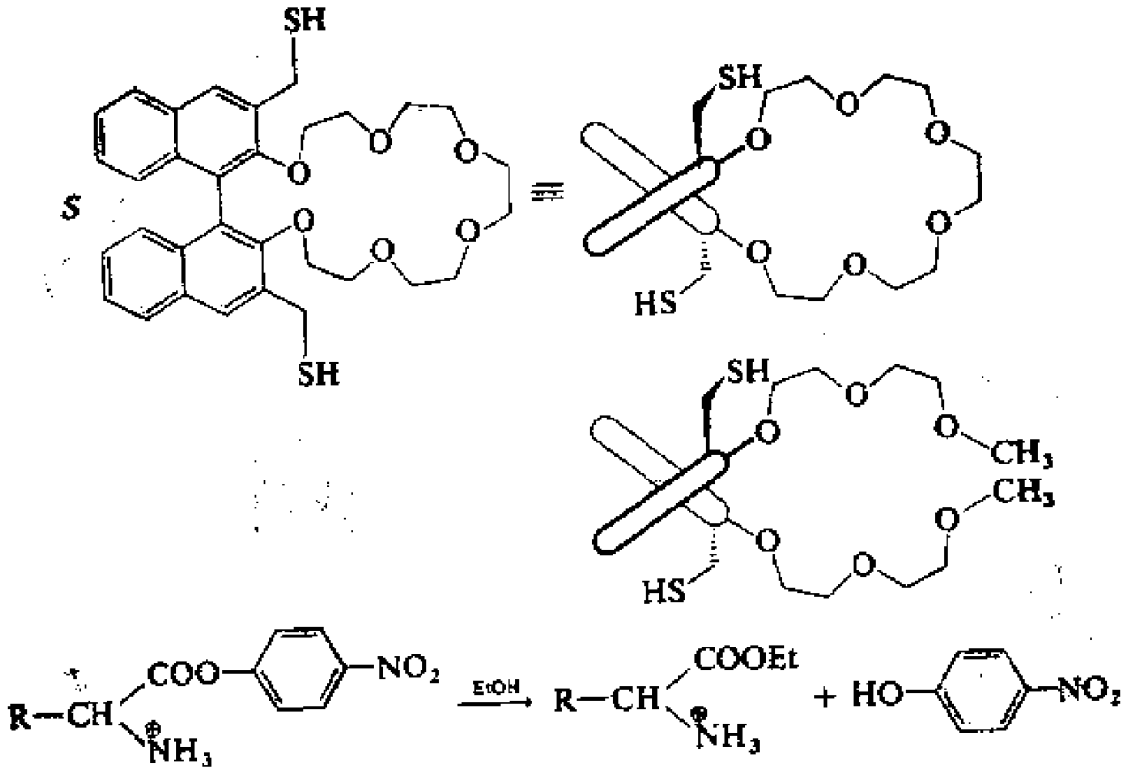


叠氮穴状化合物$6H^+$盐

5.1.2 手性识别与催化

我们已介绍了用手性大环冠醚宿主在氯仿溶液中选择性地结

合客体分子氨基酸酯盐的某一个对映体的能力。为了进一步模拟催化位置，有人设计了含有巯基催化基团的手性宿主分子，用于研究L-和D-氨基酸的对硝基苯酚酯盐的水解反应。反应形成的过渡态中间体可模拟手性宿主催化基团(巯基)与客体之间的酰基转移反应（即巯解）。此过程也模拟丝氨酸蛋白酶水解时酰化的一步。反应在20%的 EtOH-CH_2Cl和 pH 为 4.8的缓冲液内进行。

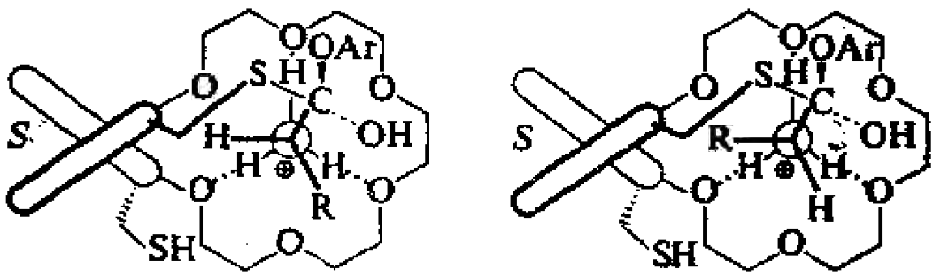


实验结果表明L-氨基酸酯与环状宿主的反应要比开链宿主快10^2～10^3倍。这是由于在前者中结合部位比较集中，因此增加了结合能力。当水解脯氨酸酯时，未发现有上述选择性，环状宿主与开链宿主对其 L-氨基酸酯表现相等的反应速率。这是因为氮原子上有三个质子对于有效地络合是需要的，使用极性较大的溶剂（40% H_2O-CH_3CN）络合速率减少10倍。显然，水分子和α-$\overset{+}{N}H_3$间的氢键形成了与宿主分子间的竞争。通常S-宿主表现出

对于L-氨基酸的较大选择性，而且反应速率受到R取代基的影响。

R	S-宿主/R-宿主
$CH_3-CH(CH_3)-$	9.2
$Ph-CH_2-$	8.2
$(CH_3)_2CHCH_2-$	6.0
CH_3-	1.0

下面的结构说明了S-宿主和L-及D-氨基酸酯客体间生成的过渡态关系。由此我们可以明白，为什么S-异构体能被选择性地水解。这是由于R基团远离手性中心，位阻较小，因此生成的中间体比较稳定。



Lehn、Sirlin等[7]制备了一个带有半胱氨酸残基的大环手性催化剂。它可以催化与伯铵盐的络合；分子内的巯基将结合的二肽酯盐进行巯解。它对于甘氨酰苯丙氨酸对硝基苯酯盐L-异构体有较大的选择催化能力，大70倍。由下式我们可以看到这种手性催化剂与底物的络合作用。伯铵盐在冠醚孔穴中的络合以及半胱氨酸巯基的参与可以生成S-酰化中间体，致使酯的水解速率增大10^3—10^4倍。这种人工酶模型兼有分子络合作用、催化加速作用和结构的或手性的识别作用，与生物催化剂十分类似。

图5.4是由上述超分子（Supermolecule）在水解此二肽酯盐的催化过程，是由四个不同步骤组成的。

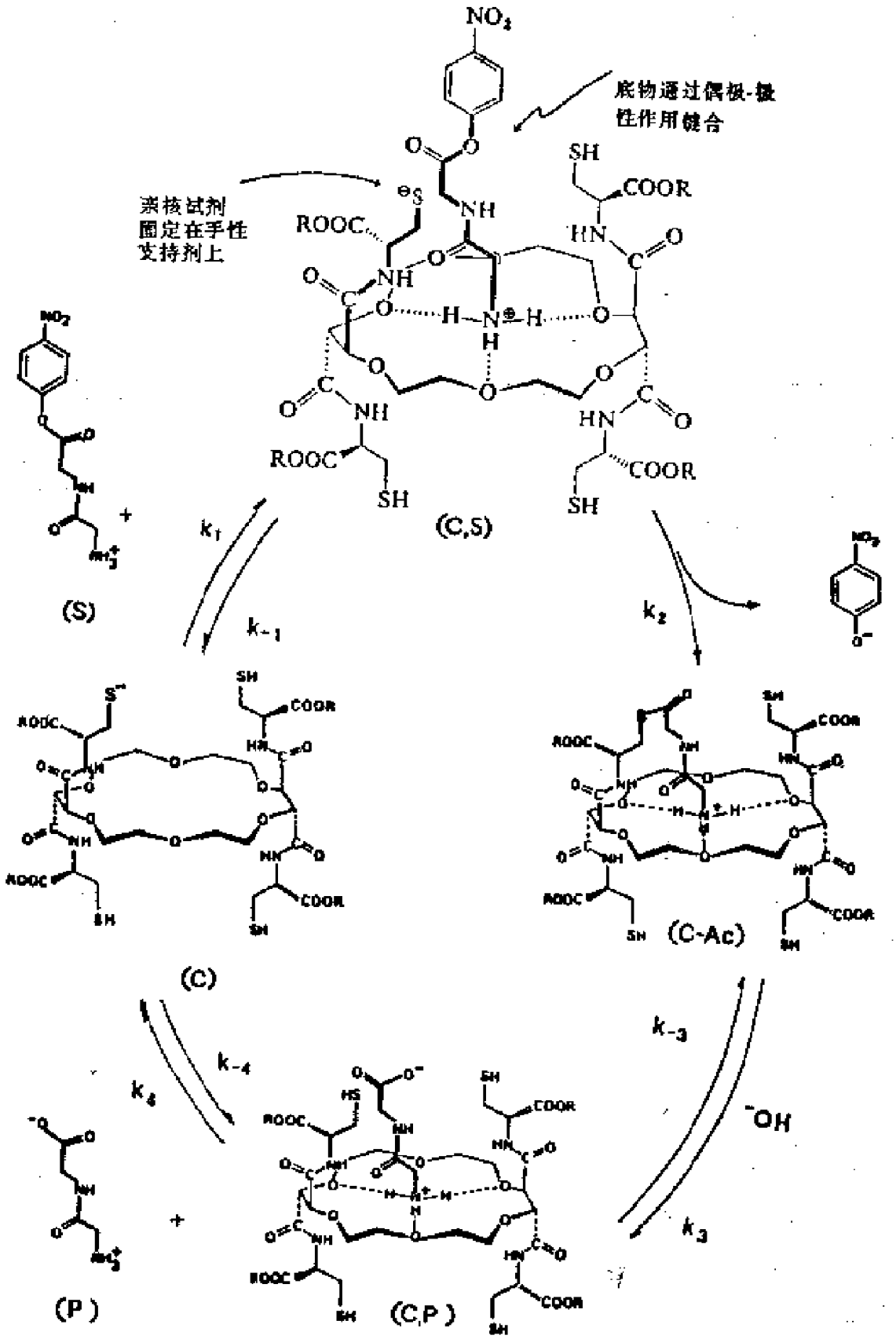
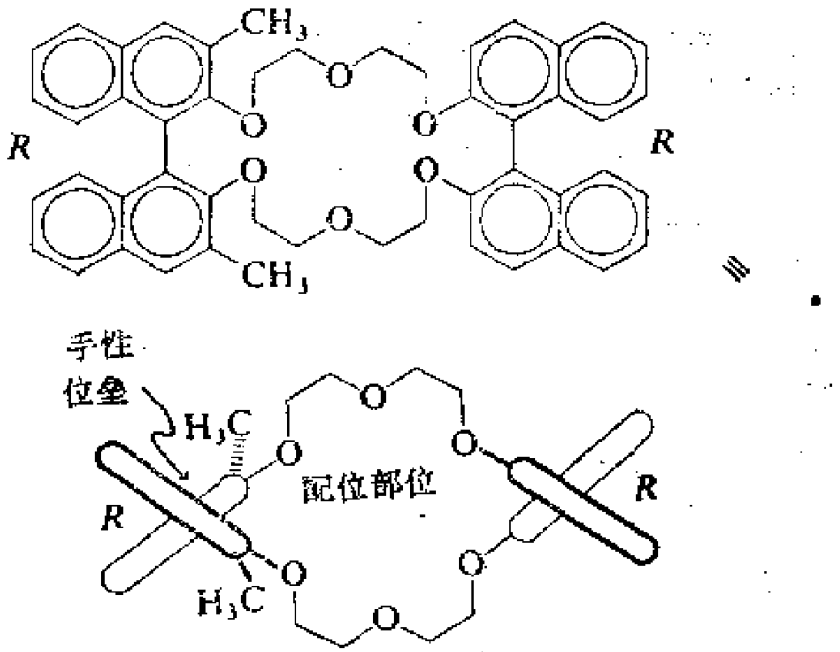


图5-4　超分子形成的催化水解二肽对硝基酚酯盐的循环

5.1.3 立体选择运输

1974年Cram等设计了一个实验，用亲脂性的手性宿主携带氨基酸酯的盐作为客体，可以从一个水相穿过氯仿层又进入另一个水相，同时它还对于对映异构体有选择性。这个实验表明：手性载体可以使手性客体跨膜运输。该实验采用不对称的双萘基（R，R）-冠醚为宿主，消旋的苯基甘氨酸甲酯为客体。



将宿主的氯仿溶液放于图5-5的U形管内。客体置于α臂内。不同时间取样测定β臂内的紫外吸收或比旋度以了解运输过程中客体分子对映体间的不同选择。实验结果是于12-19小时之后，R-客体进入β臂，其光学纯度可达80%。运输过程需要的能量来自于客体分子由一相转入另一相时的稀释热、溶剂化及盐析等作用。

前面提过的穴状配体可以和 Na^+、K^+等金属离子形成包合复合物，因此可以用作阳离子载体。穴状复合物和苦味酸根形成1:1的离子对。因而可以通过溶有配体的氯仿膜，将金属离子的苦味酸盐从与氯仿层交界的水相界面进入氯仿层，而后又从另一

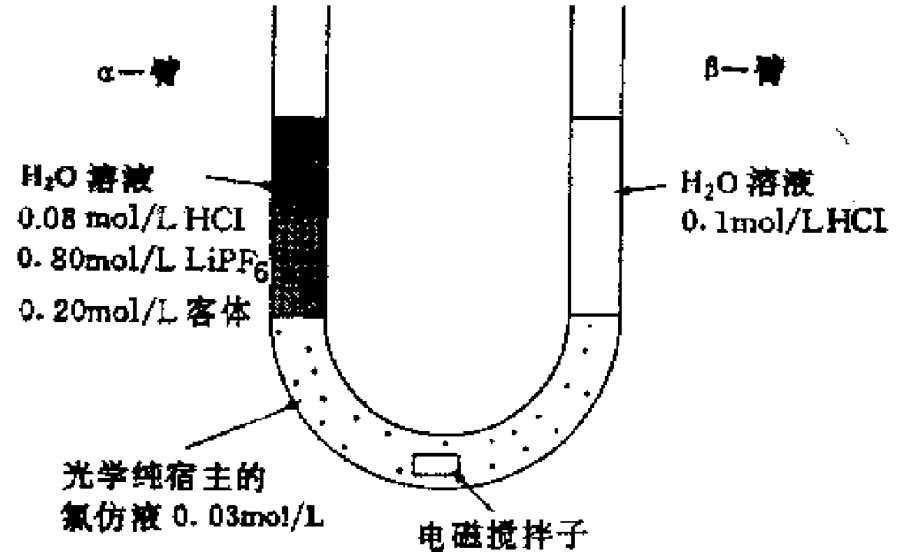
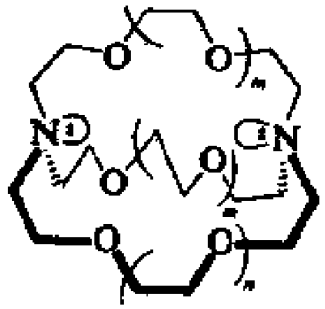


图5-5　运输过程中的手性识别实验池

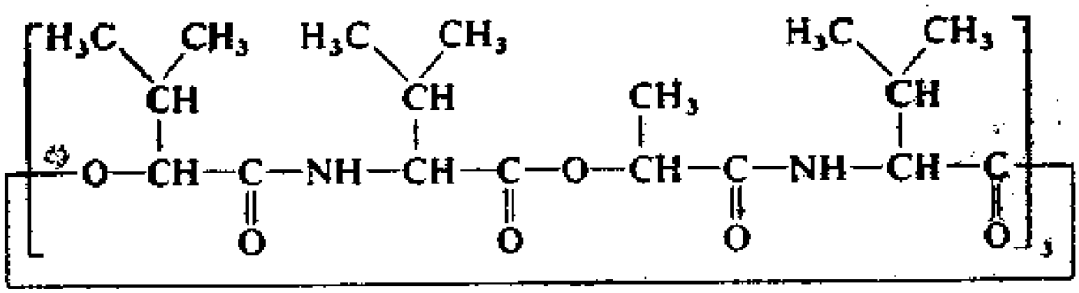


5-1　$m=n=1$　[2.2.2]
5-2　$m=1, n=2$　[3.2.2]
5-3　$m=n=2$　[3.3.3]
5-4　$m=1, n=-(CH_2)_8-$　[2.2.C_8]

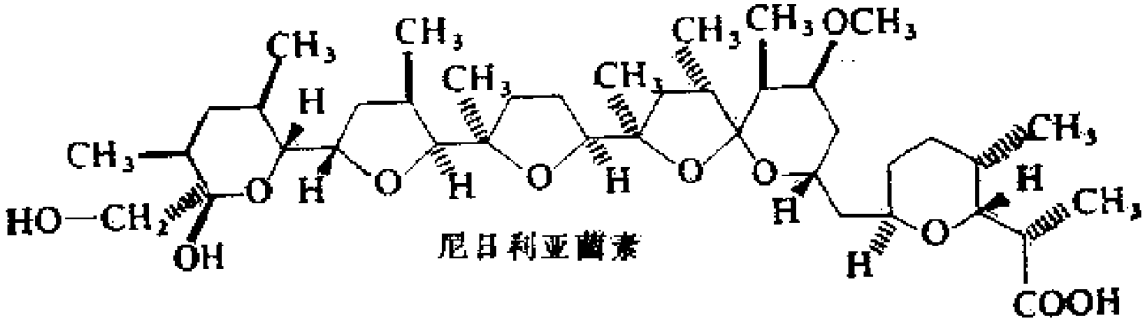
个界面处释放到水相中，通过对下述化合物的转运离子能力的比较，化合物5-4对于 Na^+和K^+ 的运输能力要比5-1快得多。这说明减少氧对离子的结合部位时，可以使上述穴状配体从离子的受体转变为离子载体。运输离子能力与形成的复合物稳定性有关。最稳定的复合物是由5-1结构形成的，因此它有较小的离子解离度。用无结合离子能力的$-CH_2-$取代氧原子可以改变它们复合或转运离子的性能。这种配位化学还可以向阴离子或其它的有机配体扩展。穴状配体最大的优点是选择性较强。如果将这些配体的空穴建成球形或筒状，对于金属离子的特异受体、分子识别、人工催化分子及选择性载体方面均有广泛前景，有可能实现以人工合成的小分子代替蛋白质职能的尝试。显然，这一领域的研究可以用于介质跨越生物膜运输过程的模拟。

5.1.4 离子载体

一些天然螯合剂，从结构上说含有聚酰胺、聚酯和聚醚等功能基，而且多数是环状化合物．它们常具有选择性地结合金属离子的功能，是离子的跨膜运输载体[9]．

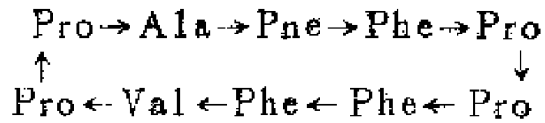


缬氨霉素



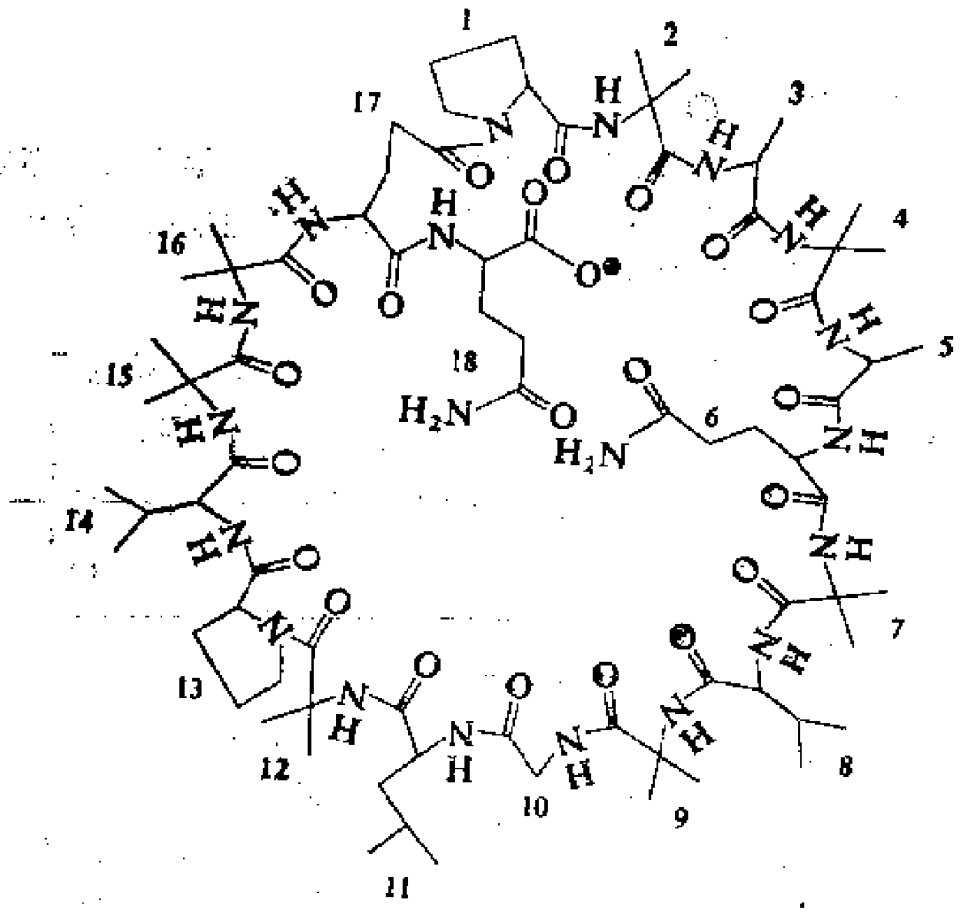
尼日利亚菌素

对于一个阳离子来说，要跨越一个约 10nm 厚的脂肪和脂蛋白形成的亲脂层确实比较困难。不过当离子被大环内部的极性功

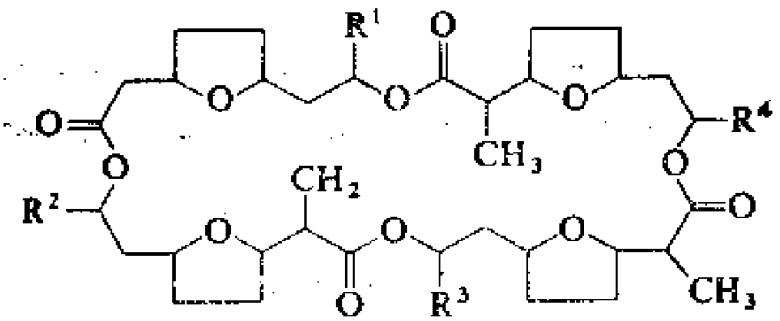


解毒霉肽

能基结合而形成疏水外壳时，跨过膜层就比较容易了．自然界的离子载体主要发现于微生物中，由于可和金属离子螯合，可将离子穿过细胞膜从而破坏细菌的细胞膜对离子的渗透性控制，常可达到杀菌的效果。其中无活菌素可以运输钠离子；而缬氨霉素则可选择性地与钾离子配位。解毒霉肽(antamanide) 是环状十肽，



丙甲菌素



无活菌素 $R^1=R^2=R^3=R^4=CH_3$

单活菌素 $R^1=R^2=R^3=CH_3$，$R^4=C_2H_5$

二活菌素 $R^1=R^3=CH_3$，$R^2=R^4=C_2H_5$

图5-6 某些离子载体的化学结构

无活菌素 nonactin $R^1=R^2=R^3=R^4=CH_3$

单活菌素 monactin $R^1=R^2=R^3=CH_3$ $R^4=C_2H_5$

二活菌素 dinactin $R^1=R^3=CH_3$ $R^2=R^4=C_2H_5$

与缬氨霉素构型不同，对于钠离子的结合比较钾离子优先。尼日利亚毒素也具有与缬氨霉素相反的选择性结合离子能力，而且当它和金属离子结合之后，可以可逆性地闭合成环。此外，离子载体还可能与细胞中其它过程如激素的跨膜运载，代谢调节及神经传递介质的通透有关。有趣的是某些离子载体内发现有D-氨基酸存在，这是高等生物中没有的情况。

1974年，Blout[9]等报告了环（L-脯-甘)n肽，(n = 3 ~ 4）对于氨基酸酯的盐的对映体具有选择性结合能力。将这种环肽与消旋的脯氨酸或苯丙氨酸酯的盐在氯仿溶液中混合之后，用^{13}C-NMR分析可以得到非对映的复合物形成的不同共振谱。D-

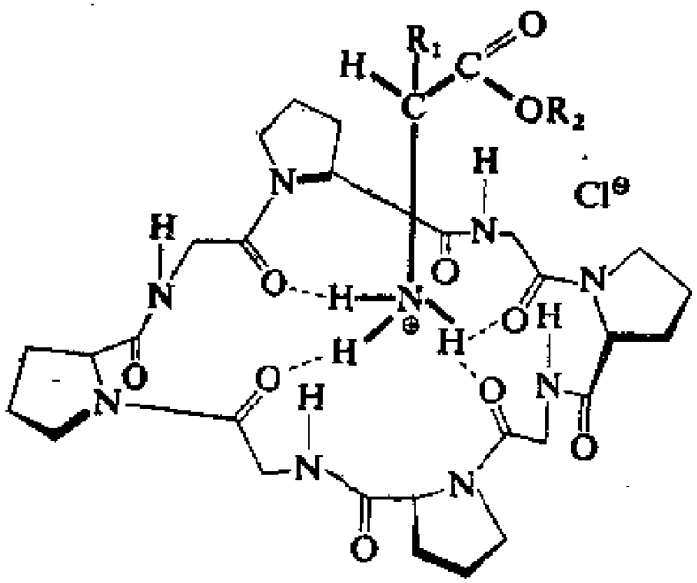


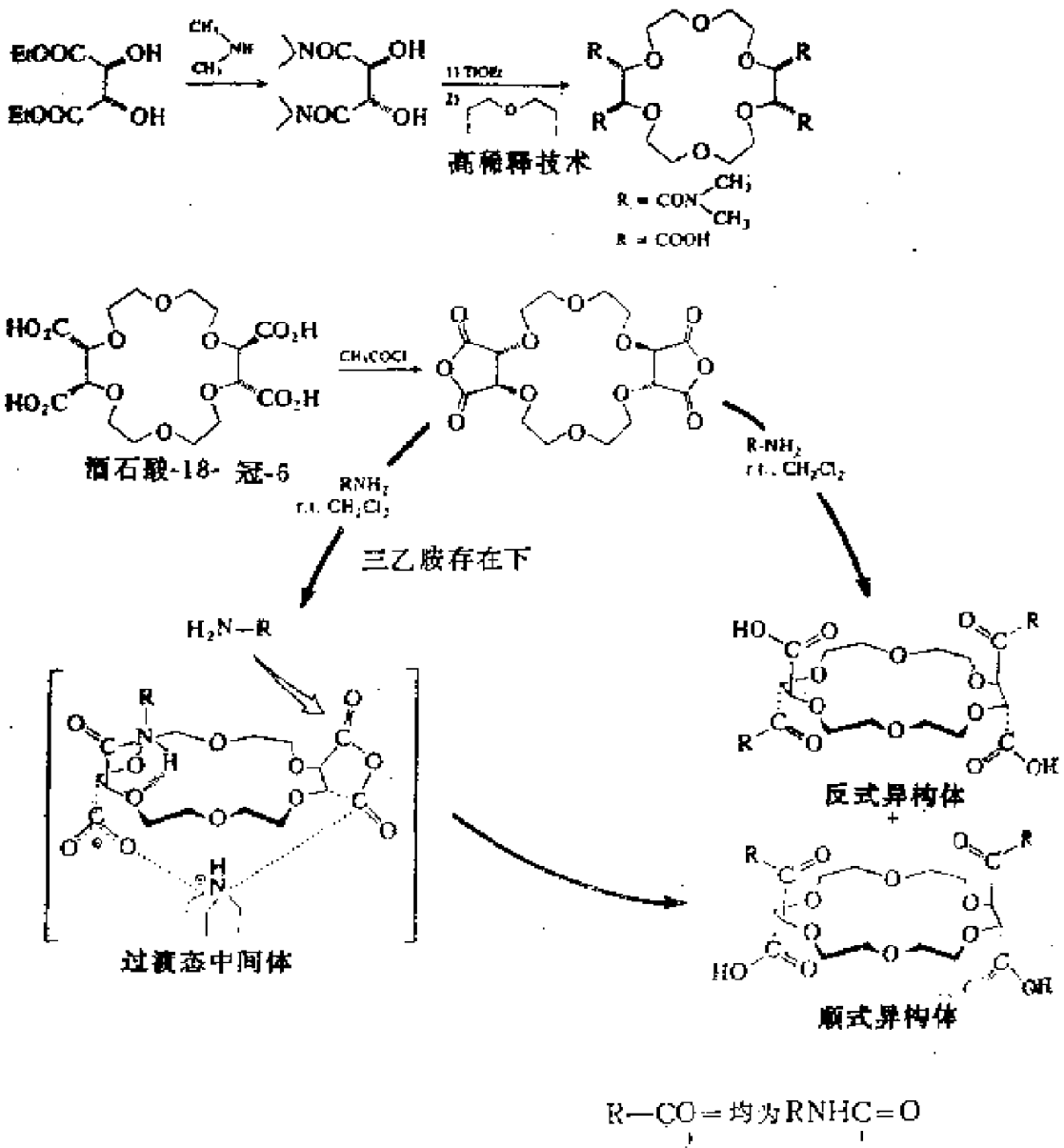
图5-7　环(L-脯-甘)$_4$肽与氨基酸酯盐的复合物

或L-氨基酸在环肽中有不同的定位。宿主分子用四个酰基将α-$\overset{+}{N}H_3$藉助氢键定位于孔穴之中。这种结构有可能用作前手性分子进行不对称诱导合成。

5.2　冠醚化学的新发展

由于冠醚对于不同体积离子间的选择性，以及手性冠醚的发

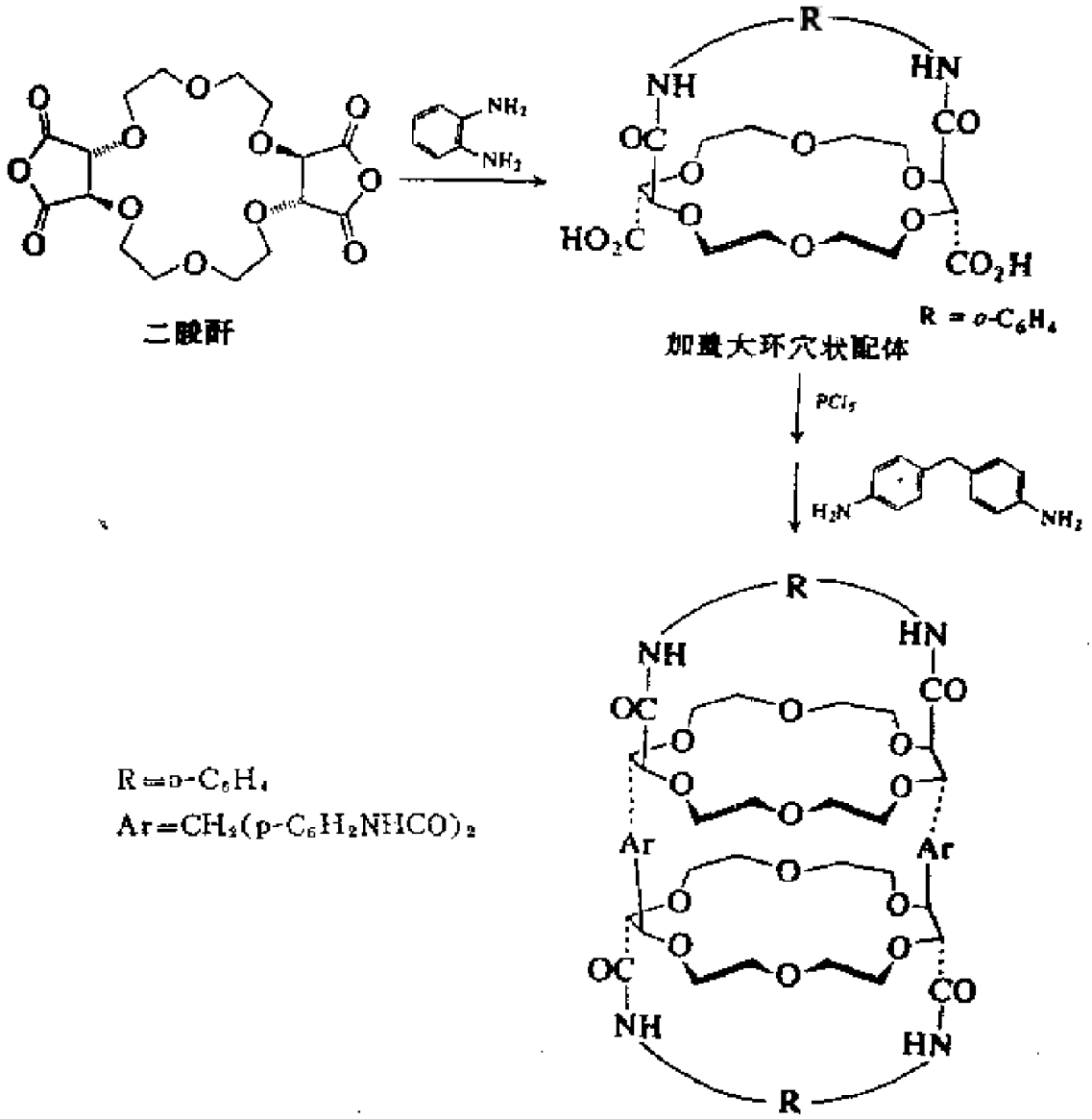
展，近年来有大量的新受体模型出现。Lehn 等由酒石酸制备了相应的四羧酸冠醚。它的生成可用下图说明：用特定的胺打开酸酐环时可以生成相应的syn-和anti-异构体混合物。当同时有三乙胺存在时，由于它与大环在一侧生成过渡态中间体，因此所用的特定胺只能在另一面同侧进攻，因而只得Syn-异构体。



R—CO—均为RNHC=O

籍助这些配体还可进一步再合成复杂的人工受体化合物。这些复合受体分子具有多个结合部位，因而可以与多功能基底物结

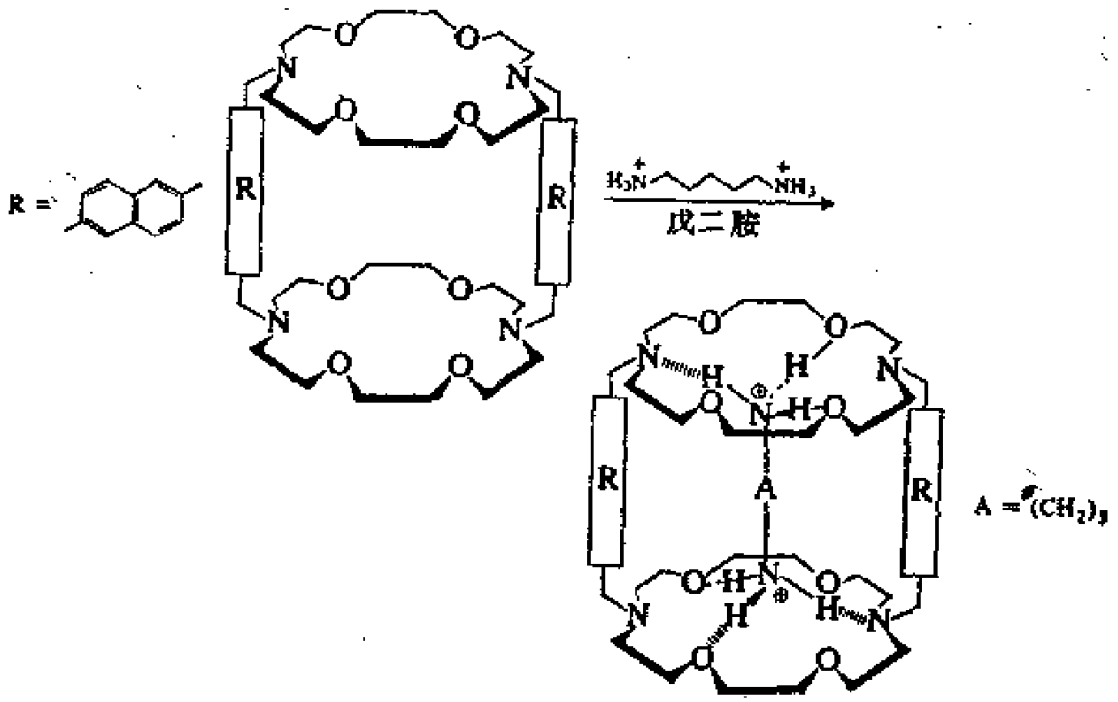
合，当和具有一定分子长度的化合物$H_3^+N—CH_2CH_2—C_6H_4—CH_2CH_2—NH_3^+$混合时利用$^1HNMR$特征化学位移研究表明，生成1:1的复合物的结合能力很强[10]。



5.2.1 含氮冠醚与大环聚胺

上面列举的复合受体与双功能基的客体分子结合能力与二者分子互补状况有关。受体两端结合部位的距离与客体分子中两个

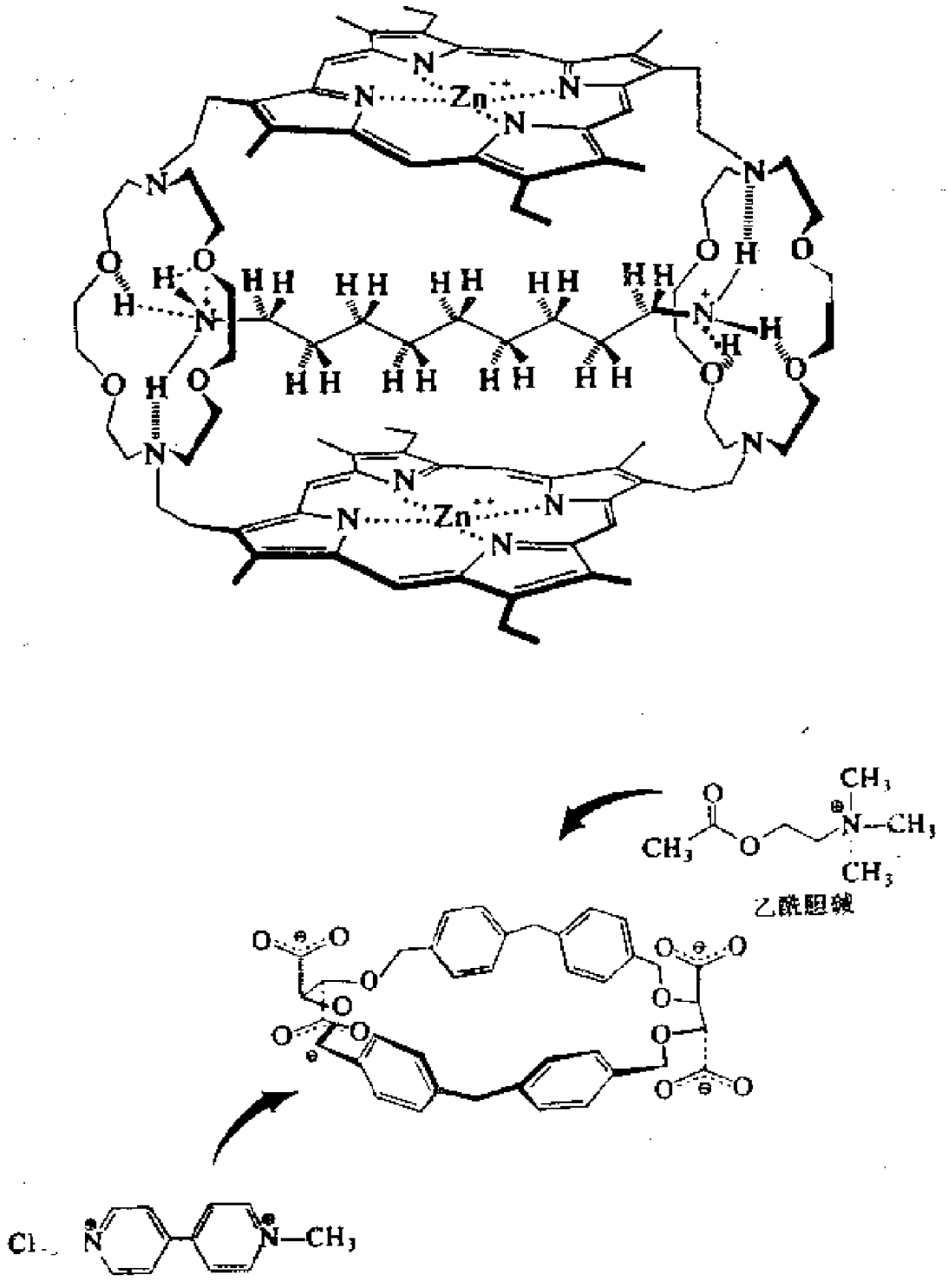
功能基间距离要相适应。下列筒状双环氮杂冠醚与二胺盐可以形成穴状化合物。如果与萘基相连时，结合1,5-戊二胺的能力要比1,4-丁二胺大。可以用二铵盐中-CH_2-的^{13}C NMR研究证实。弛豫时间可以表明底物的结合特性[15]。



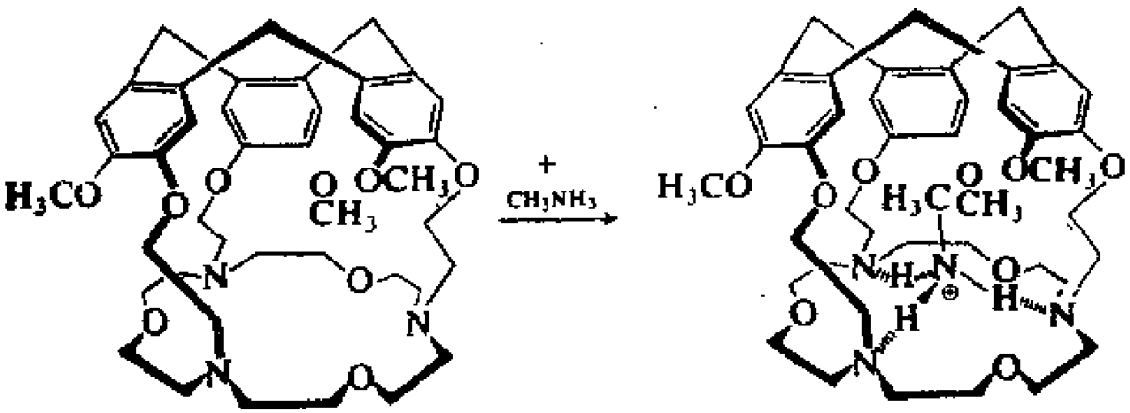
用卟啉基团代替上述萘基形成的复合受体可同时结合金属离子与有机底物，如壬二铵盐[12]，结果形成底物-复合物-金属离子的多元穴状化合物。改变大环结构可以改变其结合特征，可用以模拟金属酶。大环与卟啉中心可以起到内部调控作用(下页上)。

还有一种称为岩洞配体的分子，它是将极性亚基与不同刚性的非极性部分相结合，因此是两亲性大环复合受体。这种受体可以藉助静电引力和疏水效应与底物结合。与普通冠醚相比，它不仅可和伯铵盐作用，也可和叔、季铵底物结合。与乙酰胆碱的结合对于说明神经传导递质结合于生物受体是有意义的[13](下页下)。

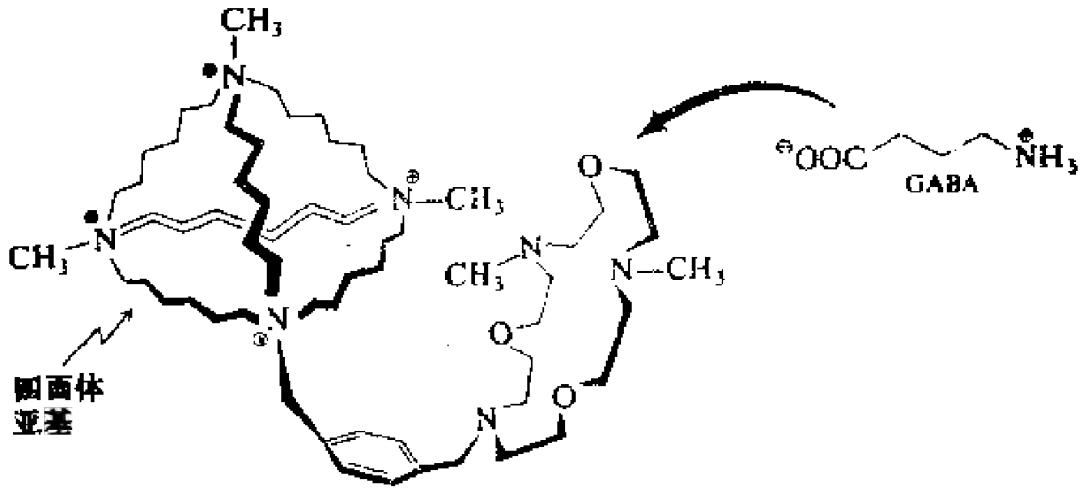
其它类似的岩洞配体如 18-冠-N_3-O_3-醚与环状三藜芦基相结合的配体，它分子紧密，孔穴中只能容纳一个甲铵离子。由



F. P Schmidtchen 所设计的双位受体可和神经递质γ-氨基丁酸（GABA）有良好的亲合力[14]。

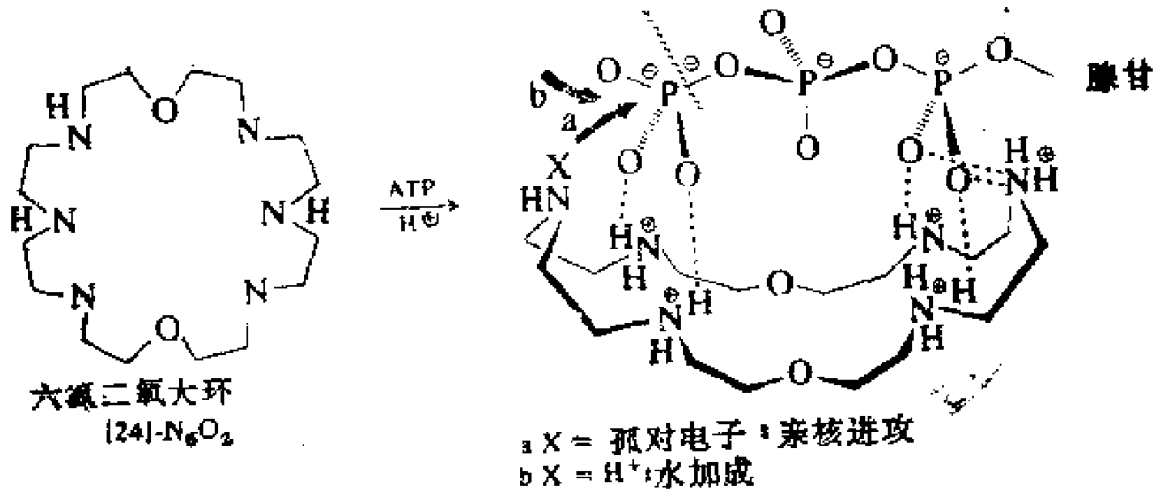


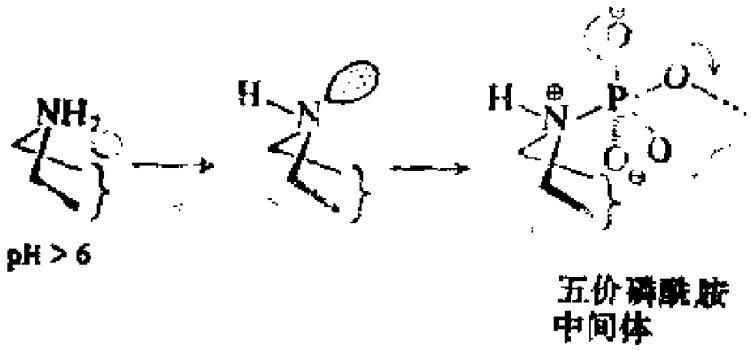
岩洞配体　　岩洞复合物

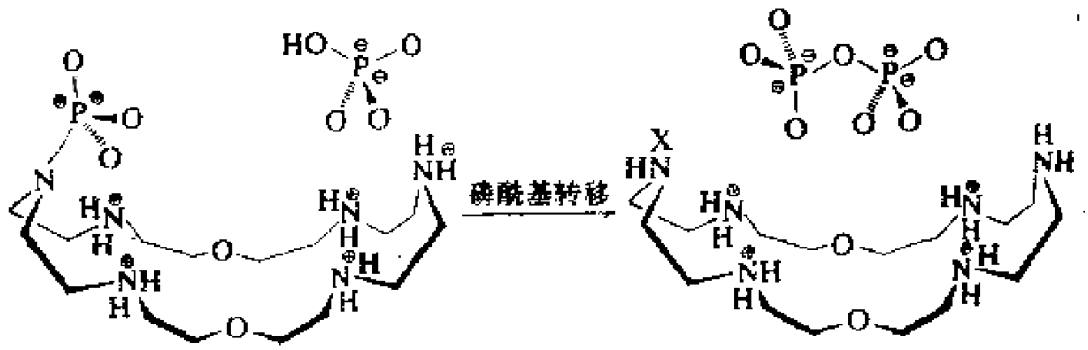


含氮大环聚胺质子化可以发展为阴离子受体。Lehn 等用〔24〕-冠-N_6O_2研究 ATP 的水解，发现在pH2.5—8.5之间反应有明显的动力学加速，结果生成 ADP 或 AMP，当 pH 大于6.5时，大环与底物生成共价中间体[15]。在这个 pH 值时，^{31}P-NMR研究表明有磷酰胺中间体形成，低pH值时未见有这种现象。如果有Ca^{++}存在，也可加速 ATP 水解，伴以焦磷酸钙盐生成，这中间包含有磷酰基的转移。

质子化的大环聚胺〔24〕-N_6O_2可以通过焦磷酸盐的生成催化乙酰磷酸酯水解。如下面图中所表示的氮杂冠醚起着双重受体的催化功能。分子中两个结合亚基均起作用，其结果是可以诱导成

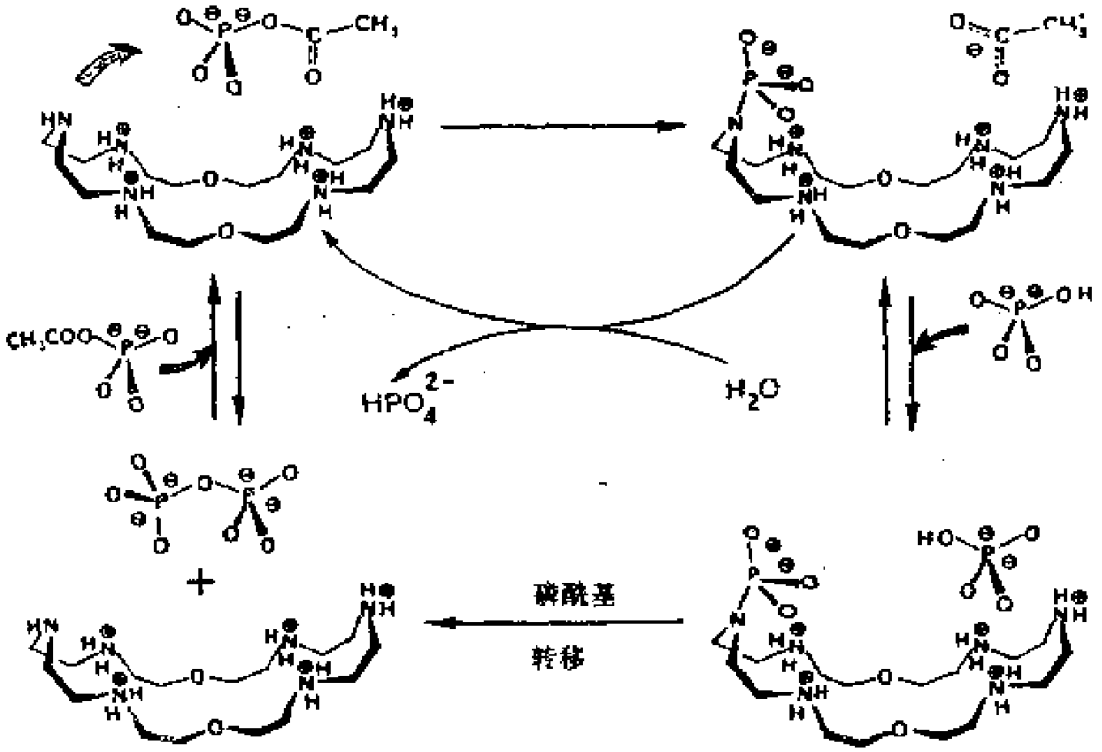




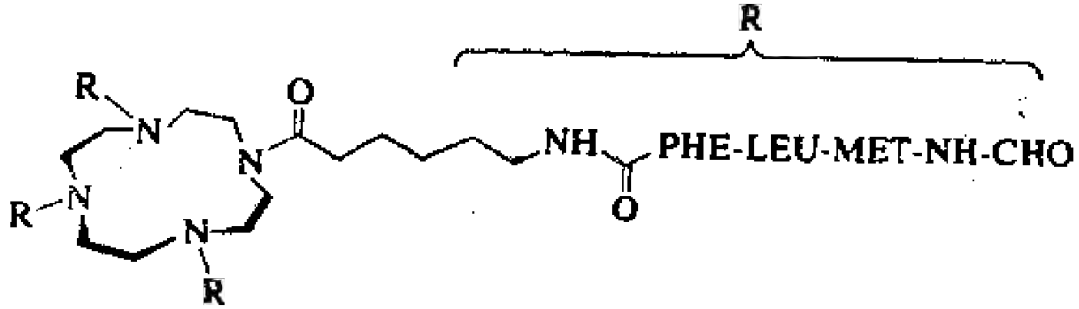


键。由此可见进一步用来模拟合成反应过程也是有可能的。

上述人工催化分子有广阔前景。它可以模拟 RNA 的裂解、拼接；也可催化生物底物磷酸化反应。最近，大环聚胺或氮杂冠醚用于固定多肽。由四个N-甲酰基-Met-Leu-Phe 肽形成的环



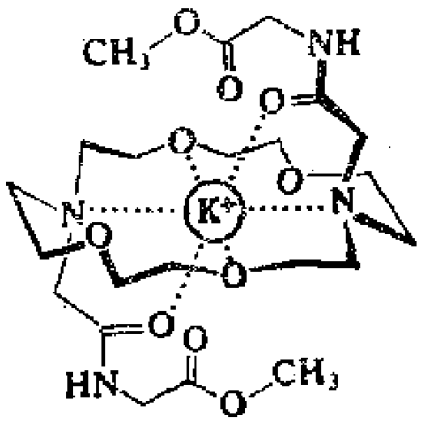
状四元簇状物已被合成。它具有从人体嗜中性白血球中释放溶菌酶的活性，与单体相比，活性要高7000倍，这暗示它与膜受体有协同作用。同时也意味着，膜上识别位置对药物的聚集作用可增



强药物效果，这是在药物设计方面的新思路。它类似于免疫学中抗原的多价性和神经肽受体的拓朴学。功能基化的冠醚为这方面研究提供了依据。

此外，曾经用带有一个或两个肽链的氮杂冠醚以结合离子和

模拟离子载体如缬氨霉素[16]，这种被称为套索的配体下节将要介绍。K^+和N，N′-双（甲基甘氨酰-甘氨酰基）-4，13-双氮-18-冠-6复合物的X-射线研究证明分子中两个肽链anti-配置，因而具有双重对称性[17]。



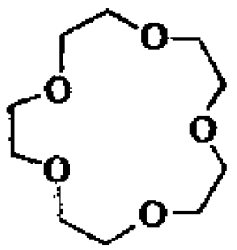
5.2.2 套索冠醚

1980年Gokel提出一种带有柔性臂的大环聚醚，臂与供电子基相连，叫作套索（Lariat）冠醚[18]。其类型可以是臂与大环醚上的碳原子相连，或与氮原子相连，也可以有两个侧臂，并且分别被叫作碳轴链醚、冠轴链醚或双臂链醚。

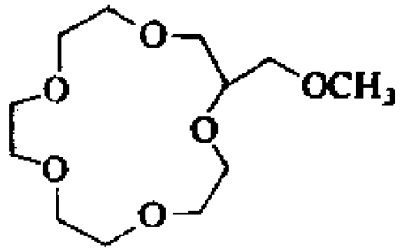
侧臂的增加不一定全是提高它们与阳离子的结合能力。溶剂可和侧臂结合，因而在极性溶剂中也有减少与阳离子的结合常数的情况。

实验结果说明臂与次甲基氧相连时，柔韧性不大，结合离子能力弱，而且依赖溶剂的极性。当臂与氮原子相连，结合离子能力大大增加。Gokel对此现象进行了理论推测，他指出：由于氮原子易于翻转构型因而减少了侧链形成的位阻，所以上述两类型的化合物有所区别(参见下页)。

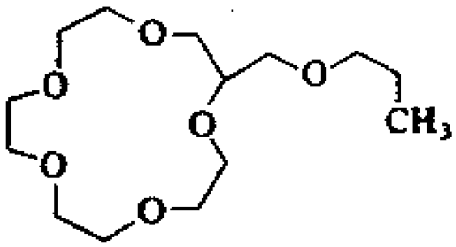
Gokel还制备了一系列N，N′-二取代的4，13-双氮-18-冠-6-醚，这类化合物对于Ca^{++}的结合力大于对Na^+和K^+的结合力。



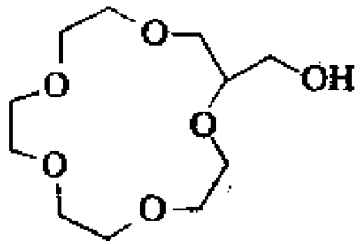
925



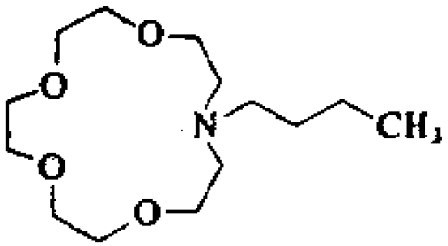
555



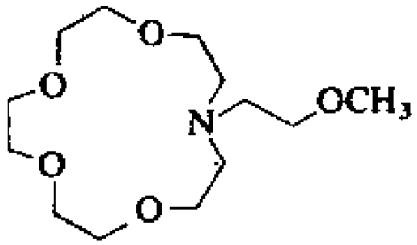
669



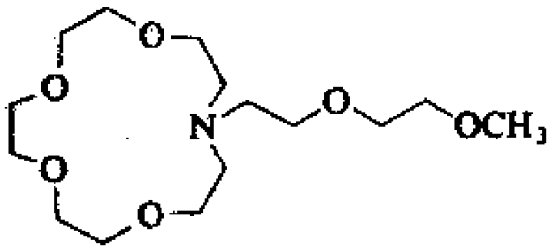
556



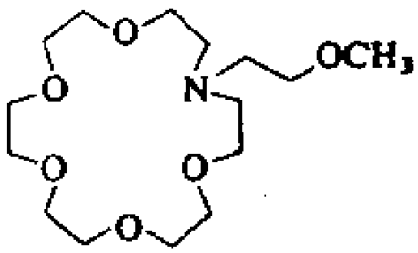
414



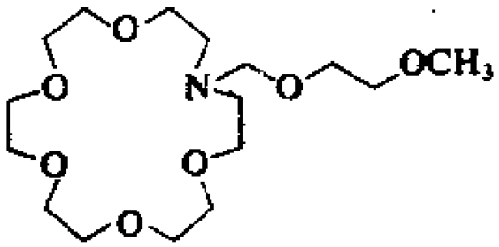
4587



14,630



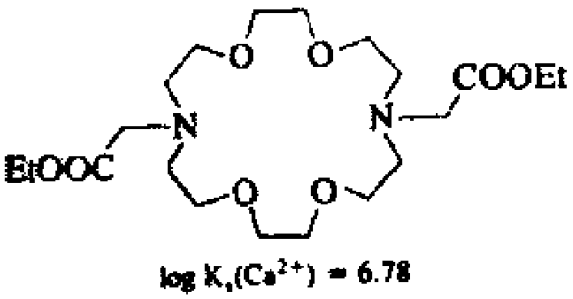
15,056



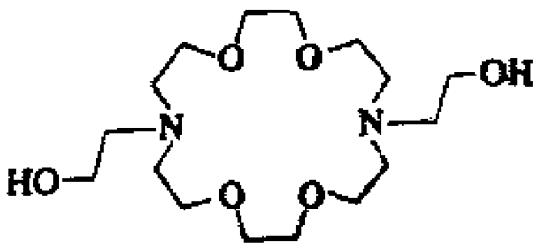
609

式下数字是Na^+在90%甲醇溶液中的Ks(结合常数)

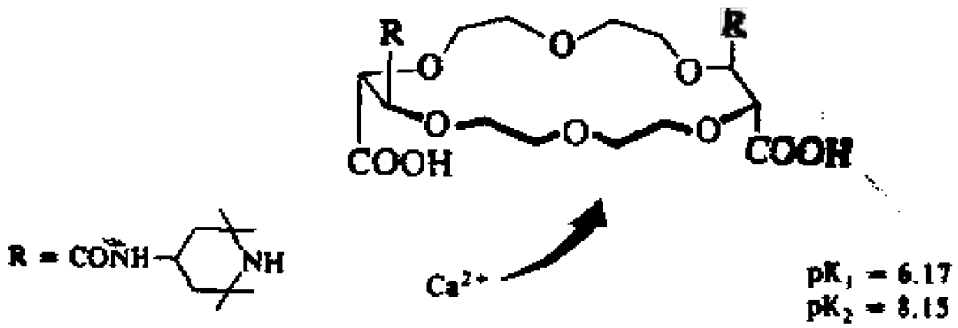
与此相似的情况是，syn-二羧基-18-冠-6-醚对Ca^{++}的结合常数Ks为9.7。因此syn-二羧酸冠醚是良好的Ca^{++}配体，这可能是由于羧酸根可以稳定与离子形成的复合物。一个带有磷酸根侧链的冠醚当与Na^{+}结合时，它的NMR图谱说明分子中的苄基上两个质子不等价，这是阴离子参与的证明[19]。

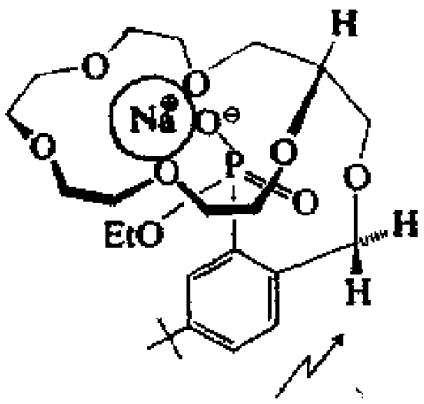


$\log K_s(Ca^{2+}) = 6.78$



$\log K_s(Ca^{2+}) = 6.02$

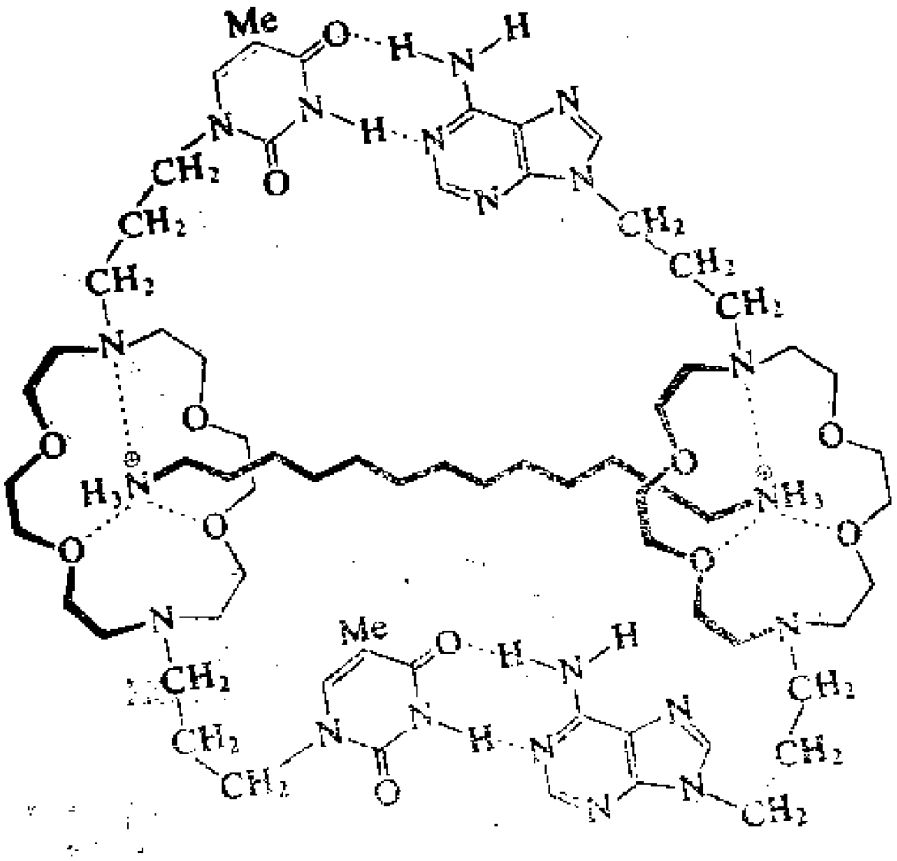




AB 四重峰苄基质子

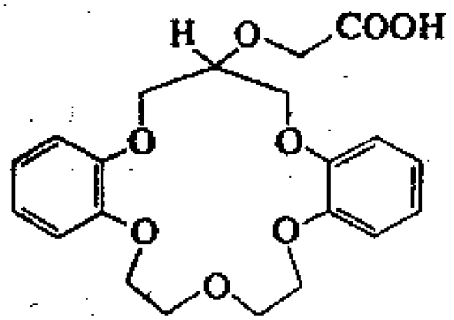
一种有腺嘌呤末端和胸腺嘧啶末端侧臂的双臂氮杂冠醚前体，藉助于氢键形成大环双环配体。分子内1，12-十二碳二铵盐

的存在有利于在水中形成自身组装的“分子盒”。这个分子用于模拟在DNA和RNA分子中双螺旋间广泛存在着的碱基配对现象[20]。



5.2.3 pH调节作用和离子选择性

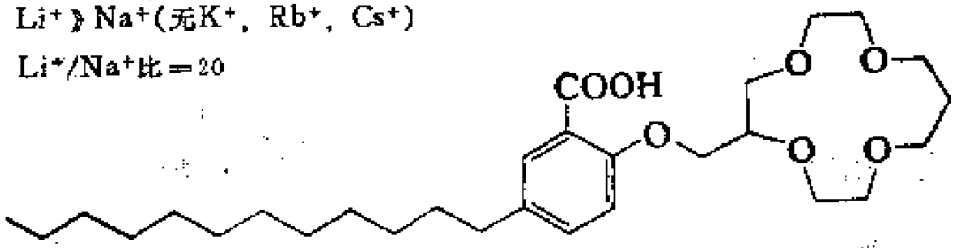
通常认为冠醚对于某一个离子的选择性只是与孔穴体积和离子半径有关，但是这只限于刚性冠醚配体。有些大环冠醚pH值可影响它对于离子的选择性和运输。R. A. Bartsch合成了一系列带有氧乙酸侧链的苯基取代冠醚[21]。比较它们对于碱金属离子的萃取能力。这类带有羧酸基的冠醚在高pH值下对Na^+有选择性，pH<6时选择结合K^+。对于Ca^{++}的结合也随pH值而变化。这说明可解离的羧酸离子载体当进行生物离子透膜转移时可受pH值调节。下面的例子可以说明有亲脂基的羧酸冠醚是锂离子



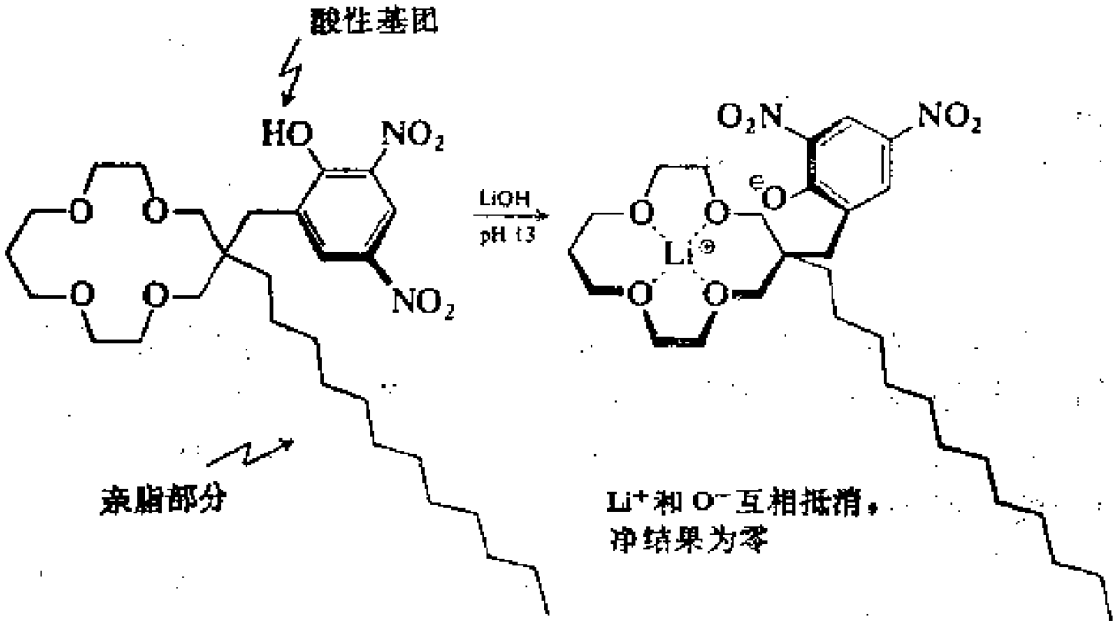
	碱性	酸性
log K(Na^+)	4.02	2.75
log K(K^+)	3.71	2.78
log K(Ca^{2+})	4.10	2 34

的竞争性萃取剂[22]。在亲脂性的14-冠-4-中插入一个易于解离的硝基酚取代基，可以形成一个受pH控制的离子载体[23]。载体

竞争萃取选择度顺序：
$Li^+ \gg Na^+$(无K^+, Rb^+, Cs^+)
Li^+/Na^+比＝20

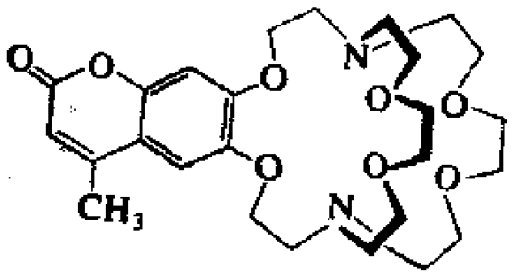


分子携带着Li^+形成电中性结合物，其跨越微孔聚丙烯膜时表现了对Li^+超过Na^+的选择性。

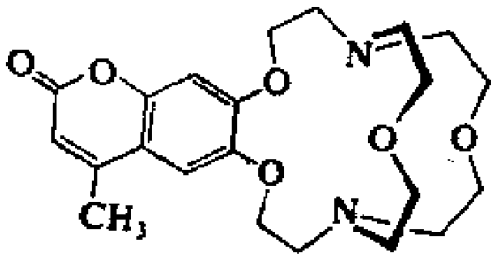


由于锂盐可用于治疗躁狂抑郁症，这类化合物可用于锂制剂

治疗时病人血浆中锂水平的测量。下列两个有荧光的穴状配体对于K^+和Li^+各有不同的选择性结合力。结合离子之后荧光度大大增加。荧光测量可以标示对于相应离子的结合数值。一种具有亲脂基团的二羧酸和二酰胺取代的18-冠-6-醚可用于对Ca^{++}和K^+

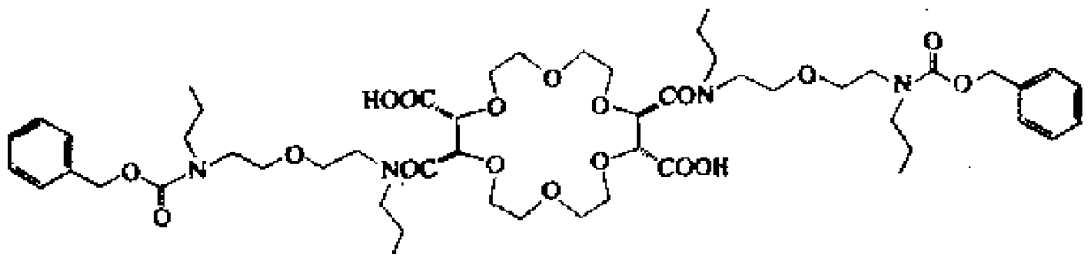


4-甲基香豆素基〔2,2,2〕
穴状配体
对K^+有选择性



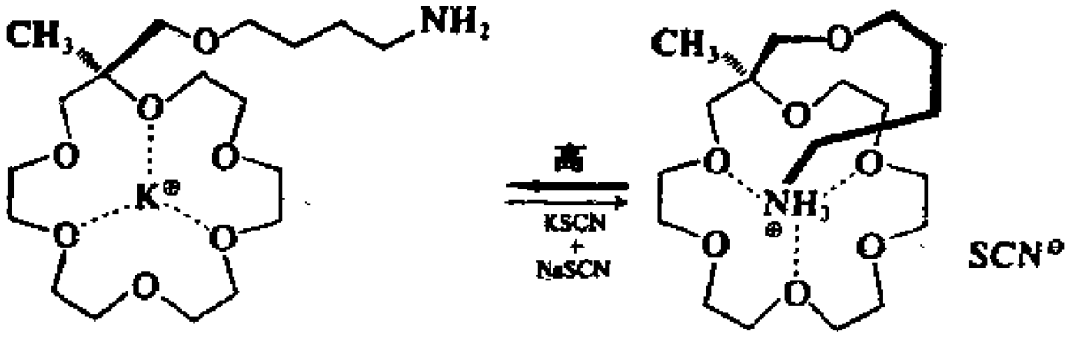
4-甲基香豆素基〔2,1,1〕
穴状配体
对Li^+有选择性

的选择运输；低 pH 值时 K^+优先结合，高 pH 值时 Ca^{++}优先结合。这些都说明设计不同的配体冠醚时，可以用 pH 值调控其离子选择性。



在同一分子中兼有18-冠-6醚和伯胺侧链的套索冠醚由于侧链臂可逆地参预，其与 K^+的结合受到pH值控制。碱性条件下，离子载体与K^+结合，跨过脂膜CH_2Cl_2层；当转入酸性水相时，由于胺基质子化形成的铵离子与 K^+ 竞争结合，犹如“自咬尾巴”，结果可把K^+放出。这个运输循环可由铵盐在碱性溶液中脱去质子来完成。

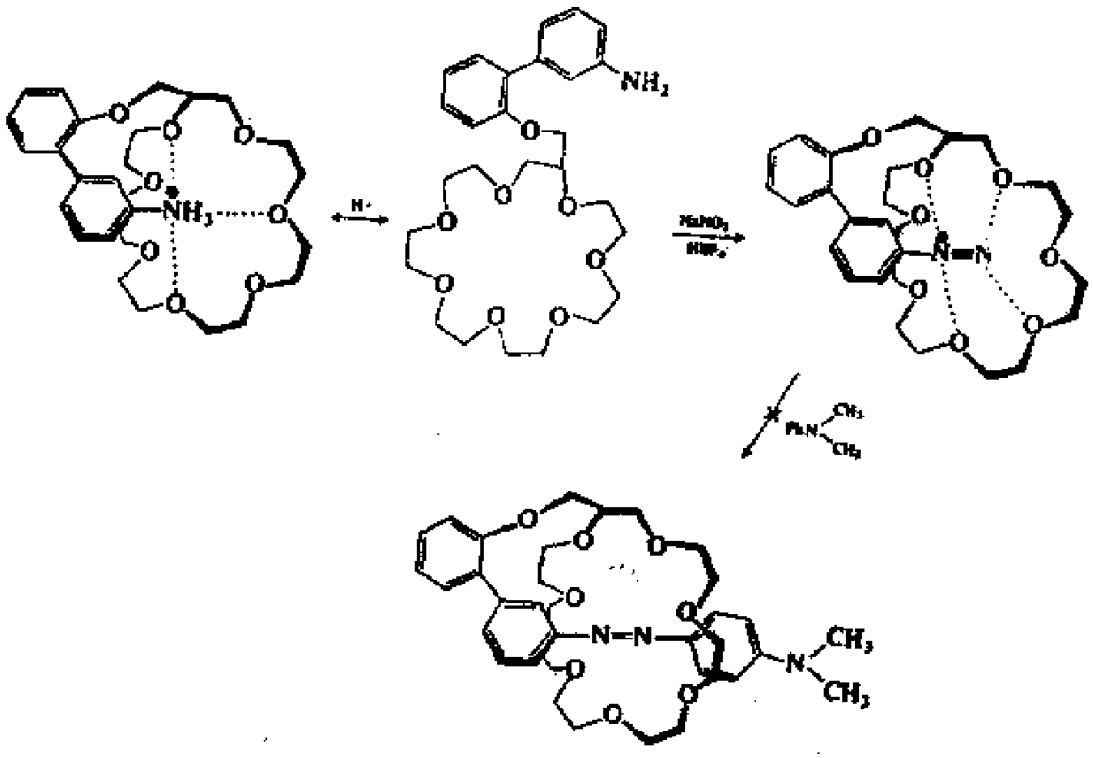
Gokel 还制备了一类苯胺基的套索冠醚[24]。氮基重氮化之



log Ks(K⁺)＝5.43　　低pH水相

高pH水相

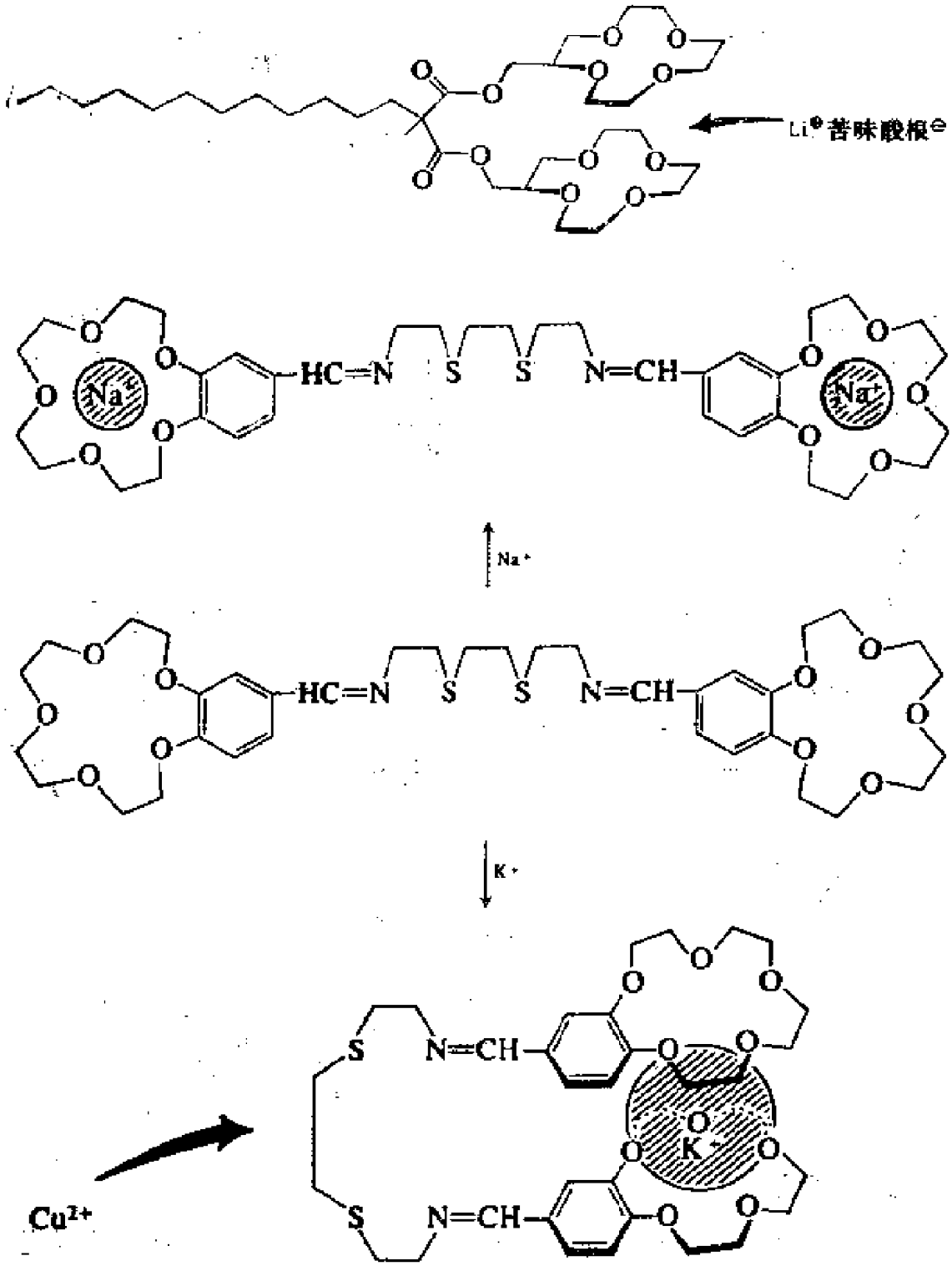
后，形成分子内的冠醚络合作用。IR谱证明了这种“驼鸟”络合物的生成。当用偶联反应试图穿针引线时，未得到通过孔穴的偶氮化合物，偶联反应在冠醚分子外进行了。



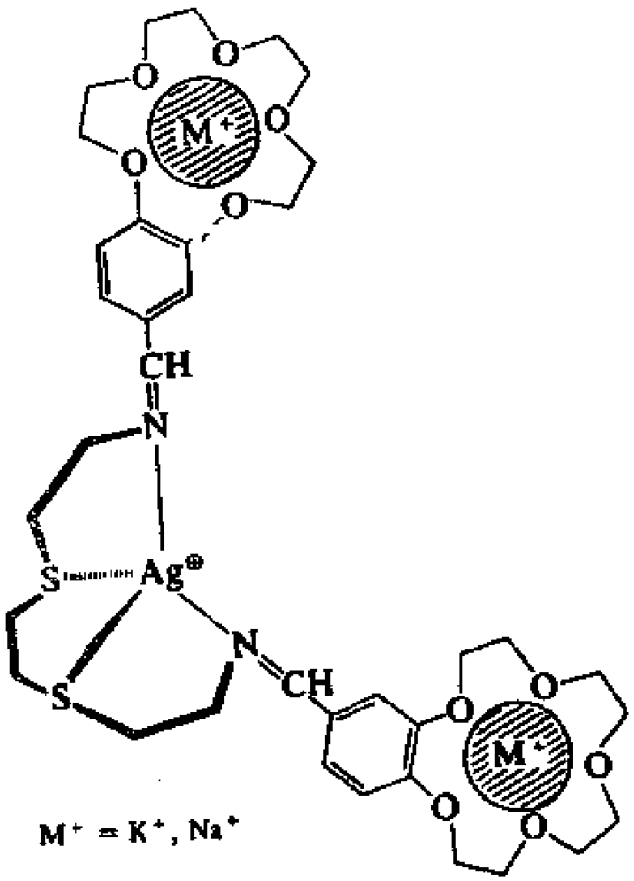
5.2.4　双冠醚

为了增加对于碱金属离子的选择性，曾设计了一种由相互连

接的二个冠醚部位形成的“三明治”式复合物。例如丙二酸酯类型的双12-冠-4-醚，其对Li^+/Na^+的萃取选择性为37。

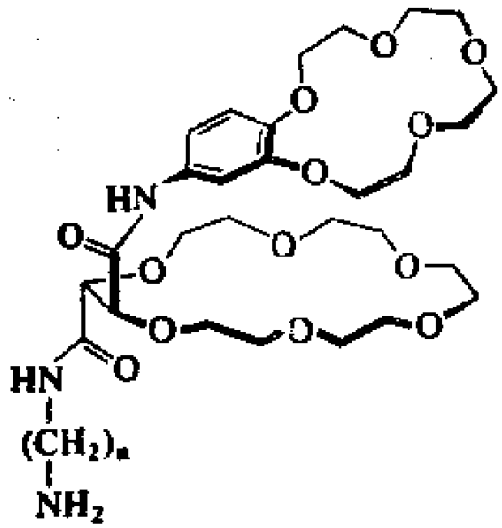


Beer发展的一类Schiff碱类型的双冠醚，可识别金属离子，但在结合不同离子时结构并不相同。例如，与Na^+结合时主客体比为1:2；K^+则为1:1，后者是形成“三明治”式复合分子。如果有Ag^+存在时，又另是一种结合方式，形成四面体配位络合物。当加入Ca^{++}时，有相似的结合状况，形成的扁平正方形络合物包含有冠醚部位及硫原子、氮原子。



(Na^+,K^+)ATP酶是一种转移酶，可以完成ATP水解过程中需要的Na^+向K^+方向的转移。为了模拟ATP酶泵[25]，设计了一类大环冠醚。这种冠醚分子具有两个不同体积的环，对Na^+和K^+具有不同的亲合力；分子中还含有一个可与之竞争的氨基侧链。当pH值较低时，铵盐形成，这时对Na^+运输较K^+快。而在高pH值下、两个离子均可运输。不过选择性并不大，原因是形成的铵盐尾巴会由于侧链成trans-构型而难以插入冠醚孔穴中。当n = 4时情况有所改善。为了克服这一困难可将酰胺键代之以

酰键，以消除不希望的cis和trans构型间的变换。



		转移速率	
		pH 6	pH 10
n = 2	Na^+	7.08	11.19
	K^+	5.74	7.78
n = 4	Na^+	8.67	13.61
	K^+	4.70	11.86

图5-8说明了这个Na^+/K^+选择运输系统。其结果是将Na^+由相Ⅰ转入相Ⅱ，同时伴以K^+的相反运输。这个离子运输机与天然的运输系统相比固然简单化，但很相似。

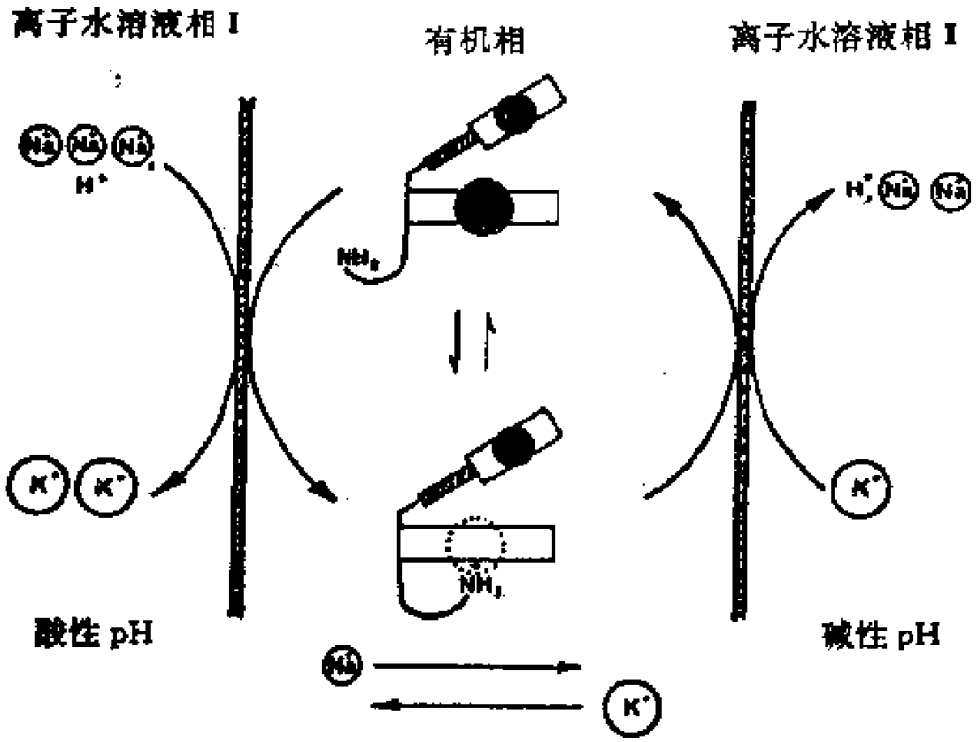


图5-8 离子运输机

5.2.5 光敏冠醚

Shinkai[26]设计了一类具有光敏基团的冠醚，它可由光控制离子的萃取或运输。例如偶氮双苯骈冠醚用紫外光照射时，形成trans-构型向cis-的异构化。cis-异构体可和碱金属离子形成1:1的三明治式络合物。这像是一个“光电钳”，可在溶液中运输离子。cis-构型又可转换为稳定的trans-构型而失去离子，反复的蝶式运动可以把K^+从与邻-二氯苯相交界的一个水相转入到另一水相。这一运输过程是光诱导的。

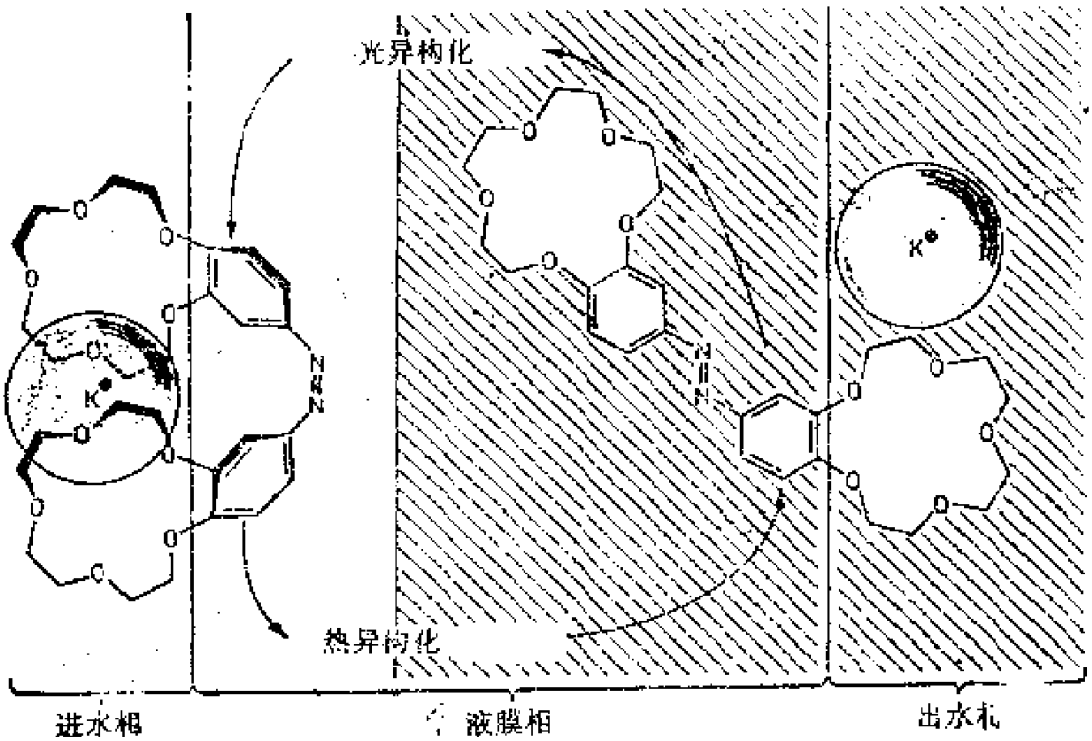
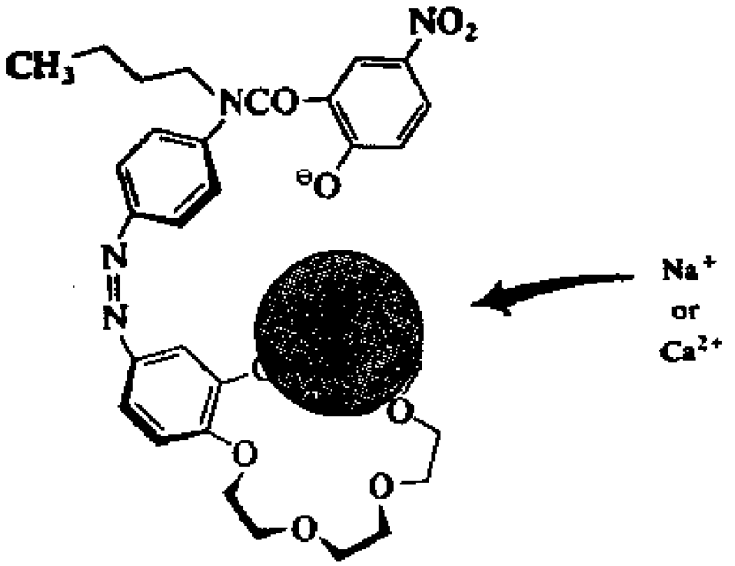
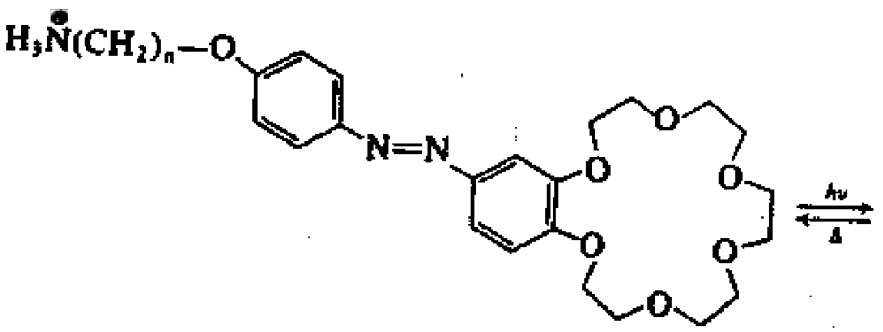


图5-9 由光敏冠醚形成的光诱导K^+运输

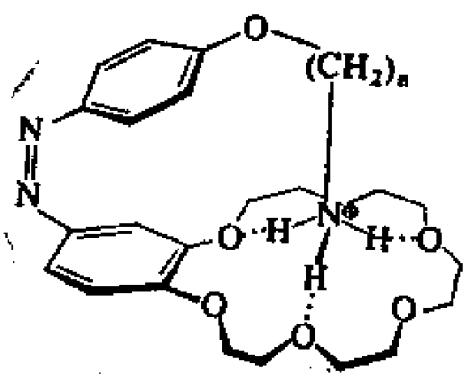
光敏配体也可以是一个有光敏阴离子的帽子组成的冠醚。由于酚盐的参预形成了“三明治”式络合物，也可以促进Ca^{++}和Na^+的提取式跨膜运输。与此相似的还有光敏套索冠醚。这类配



三明治式复合物

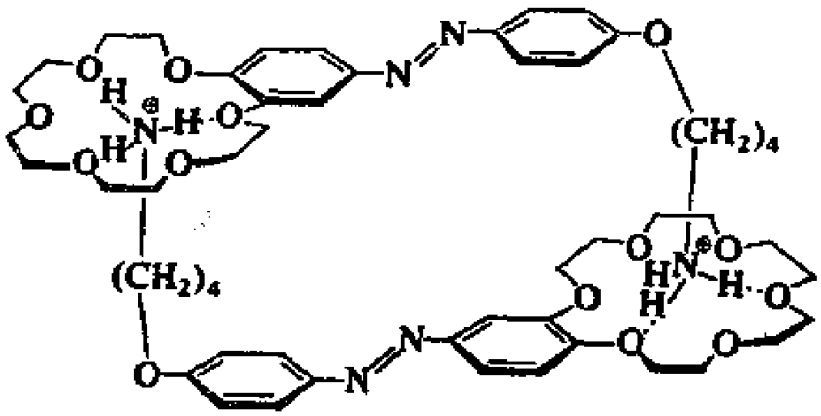


反式



n = 4, 6 和 10

顺式



体结构中的 n = 4 时，由于尾巴长度不够，不能自身插入冠醚孔穴，则以二聚体络合物形式结合。结构变化可由电导观察。

当 n = 6 和10时，随着trans-向cis-构型的光敏转换，电导增加。图5-10表示了光控制的K^+运输。

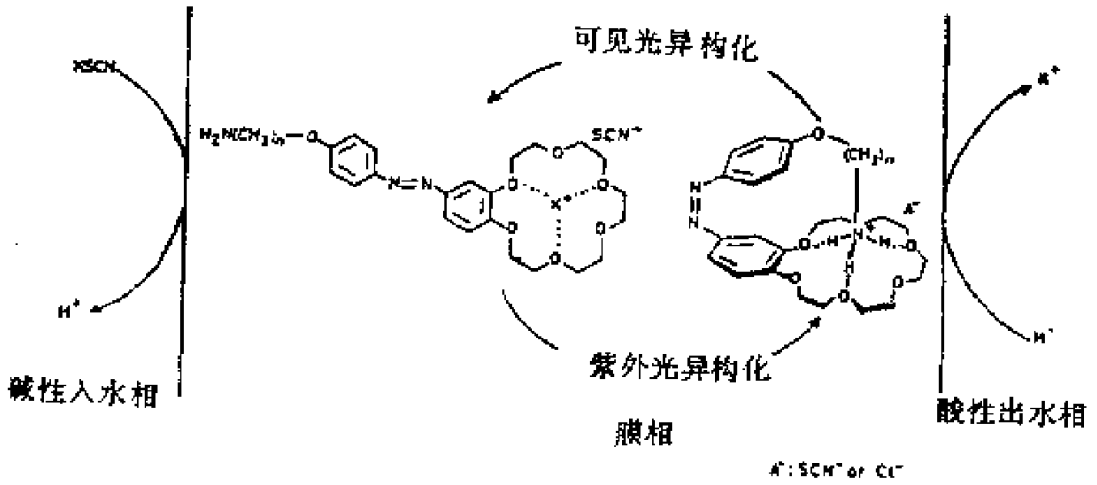
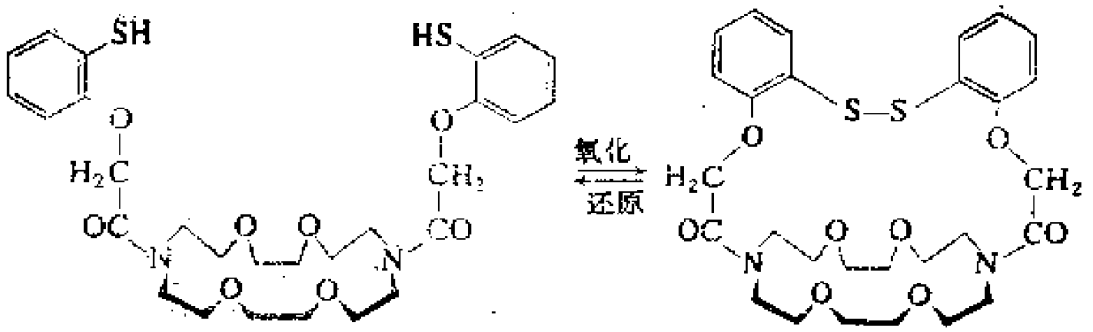


图5-10　光诱导的K^+自碱性水相经有机液膜转入酸性有机相的运输

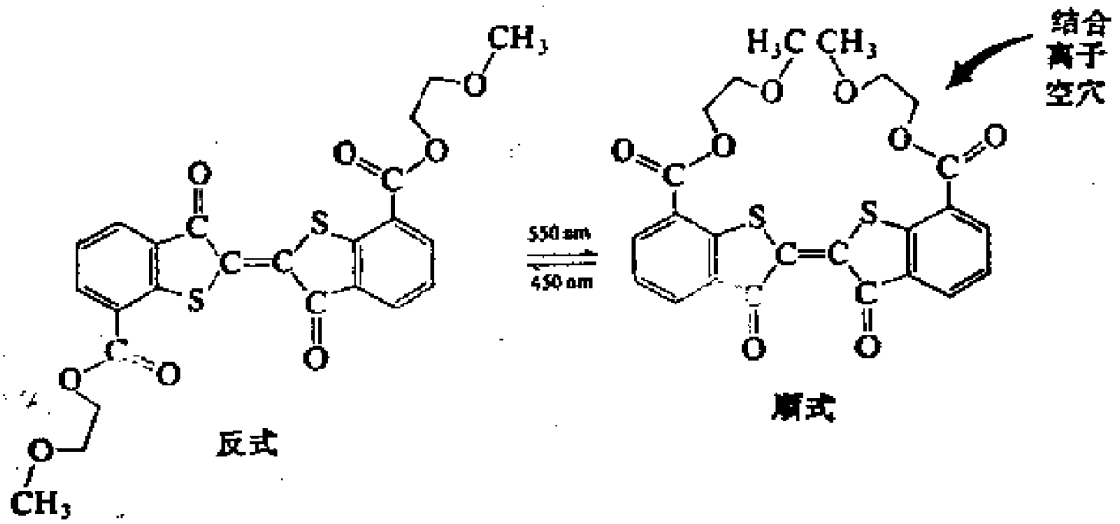
仿生化学中闸门系统的设计使我们认识到许多兴奋性调节可以通过 pH、光线和氧化还原电位的变化进行。巯基冠醚可以用来设计氧化还原闸门，这类配体的氧化型比较其还原型来说与K^+、Rb^+、Cs^+结合能力大；不过对Na^+未见差别。二硫键的参



还原型冠醚结构　　氧化型穴状结构

预对Na^+不起作用，可能是由于它已“巢居”冠醚之内，而K^+等只是“停落”在冠醚之上。由此，藉助于氧化还原反应可以达到离子或药物的跨膜运输。

生物进化中发展了一些光学活性器官以与环境中光线和电离辐射适应。例如植物中的光敏系统使它能利用光作为能源。有些生物形成了光感受器适应光的强度、持续时间，以便生存。某些生物体用光作为情报来源或应变的触发剂。Irie和Kato曾提出用光敏分子钳控制对离子结合力的设想。利用有聚醚侧链的硫代靛蓝，藉助于光的trans-cis异构化调节与金属离子的结合。已知硫代靛蓝在不同构型时有不同的最大吸收光谱。当处于trans-型时



不能与金属离子结合，以合适的光波幅射形成 cis 构型后可以 $Na^+ < Rb^+ < K^+$ 的顺序选择性结合。对于软金属离子如 Ag^+、Hg^{++}、Cu^{++}等，cis-型结合力更强，例如与 Ag^+ 结合常数为 10^{-6} mol/L。用529nm和488m光波交替幅照，这个配体可将苦味酸银跨越1.2-二氯乙烷液膜运载到另一个液相水中。上述研究指出，光敏冠醚可以用作离子载体，也可作为离子结合探针。

5.2.6 球状配体

结晶的冠醚和穴状配体的结构中本来并不具有孔穴，因为有1—2个亚甲基伸向分子中心。但是它们相应的络合物的结晶结构中含有由离子充满的孔穴。

Cram 设计并合成了一类新的有机宿主分子，它含有强制性孔穴。当不存在离子时，配体本身就有孔穴存在。与离子络合之后，孔穴则被填满。这种配体称为球状配体[52]。分子内含有氧或氮原子，藉助于孤对电子撑起一个球形孔穴并经其它骨架部分增强。这种配体分子由于固有一种骨架结构，因此与离子结合的常数急剧增加。例如在图5-11中列出的球状配体，其离子结合能可高达9.6KJ/mol，结合常数为10^{10}—10^{11} L·mol^{-1}。不过这类配体分子中碳氢原子比例很大，因而水溶解度很小，所以从水中萃取离子的速度很慢。为了克服这一现象，由环状尿素代替了苯甲醚。这种分子位阻小，而且有较多的氢键结合部位(194页下)。

合成球形配体以及其它的有机盆形和杯状的，带有强制性孔穴的有机化合物在有机化学领域是一种高超技艺[28]。类似的其它结构还有半球体化合物，非环状多结合部位的宿主等。这些球状配体很像“分子笼”，能将离子捕捉并永久性关住它们。一种被称为牢笼（Carcerand）的化合物是由拉丁语“监牢”而得名。

以上设计的宿主分子除了与离子结合之外，还可以和小的分

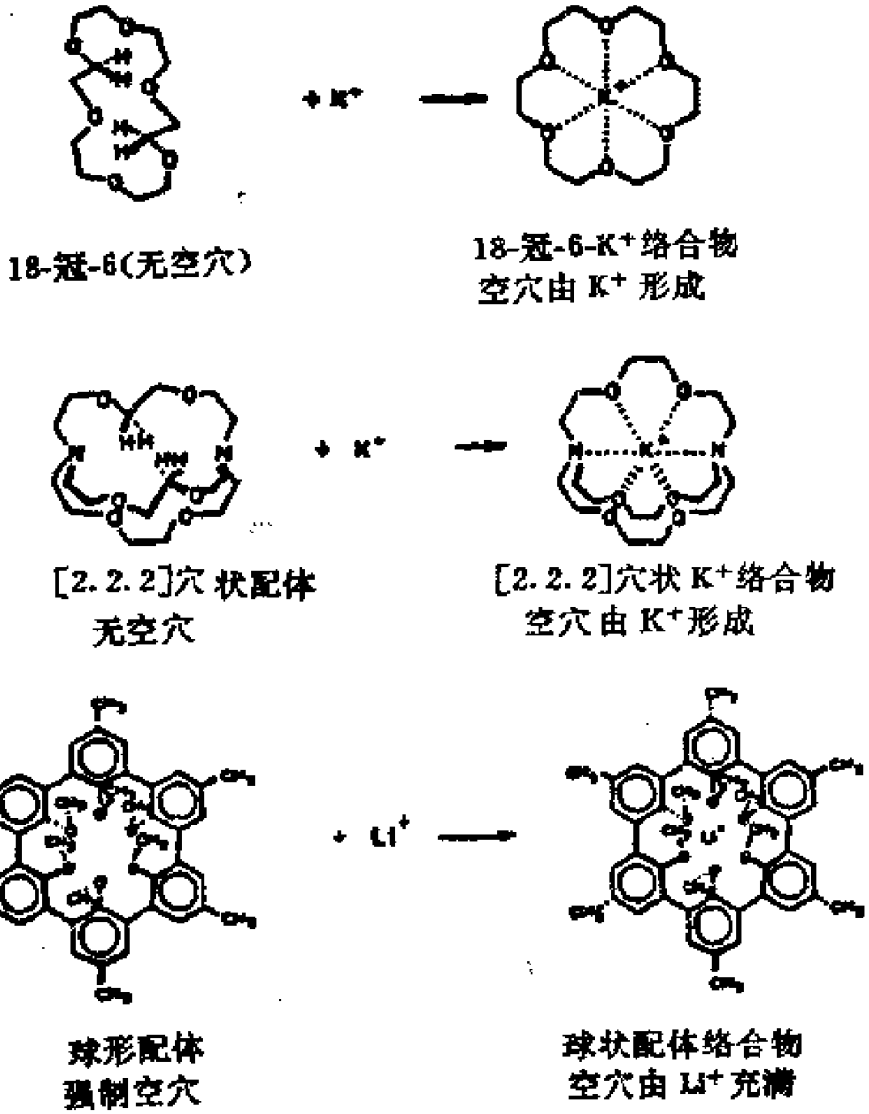
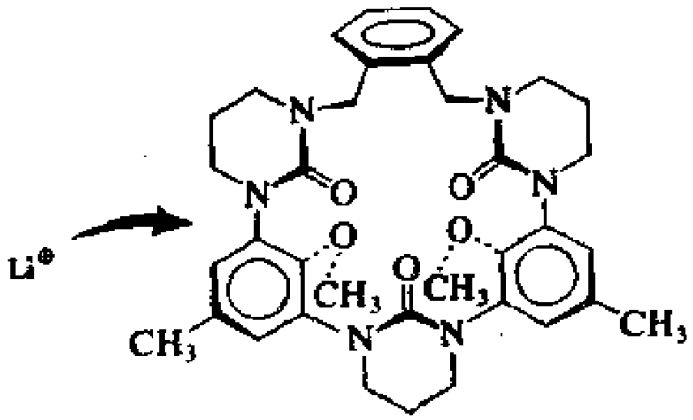
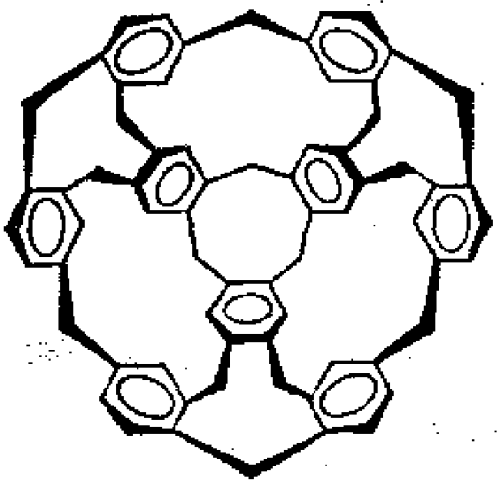
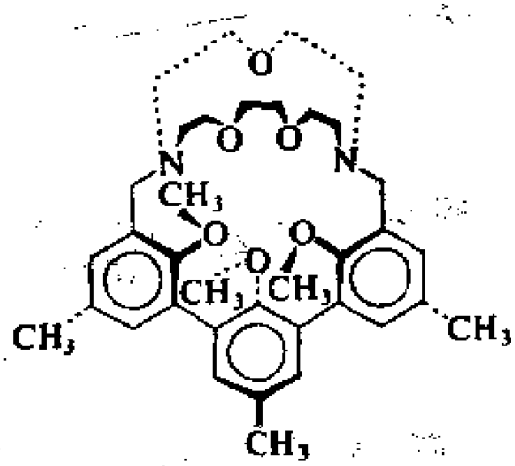


图5-11 冠醚、穴状配体与球配体比较

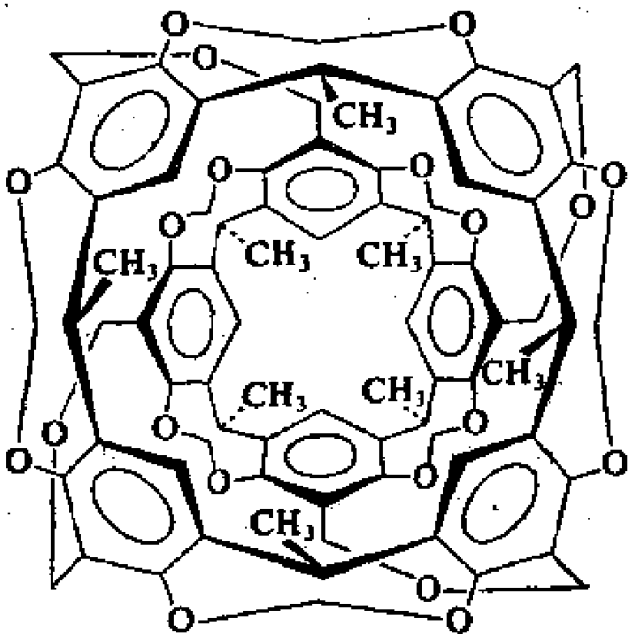




球形杯芳烃

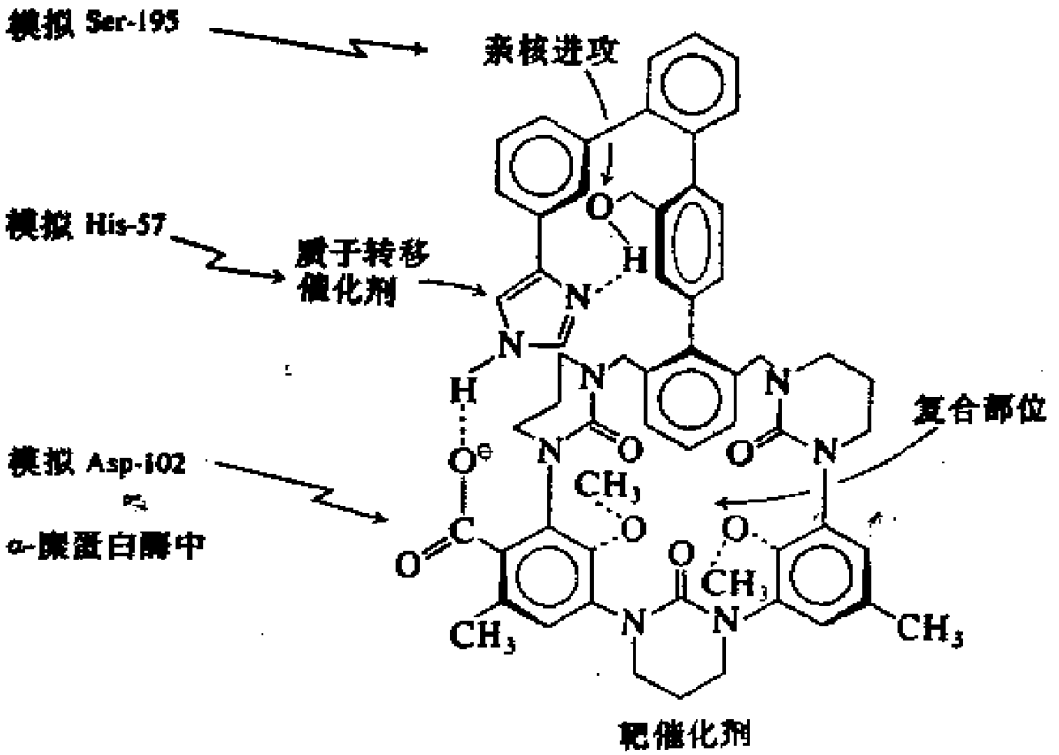


穴状球体



"半笼"

子如CO_2、N_2、CH_4结合。因此可以利用上述化合物的孔穴模拟光合作用和植物固氮。不久的将来定会进行这种研究。另外的研究课题是利用有分子孔穴的配体模拟细胞膜通透小分子的过程。Cram等人在这方面作了许多开创性工作，例如对α-糜蛋白酶的模拟。所设计的目标催化剂是对酶的酰基转移的模拟，分子内有配置好的键合和催化基团与氨基酸酯盐或氨基酰胺等底物能

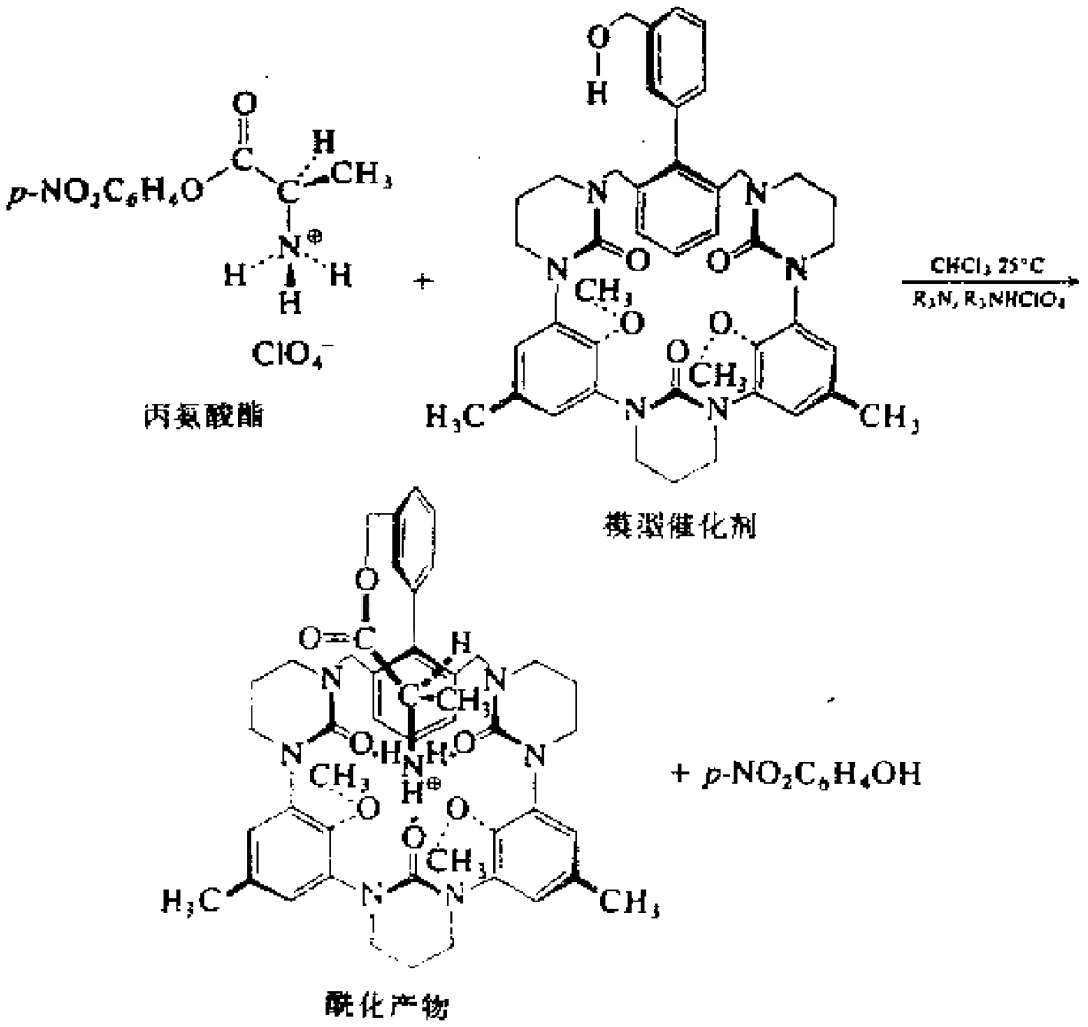


相互匹配[29]。

由于问题比较复杂，对于丝氨酸酰化转移酶的模拟只能是近似的。例如这种催化模型对于丙氨酸酯的酰基转移反应所显示的催化能力要比底物和一个无结合力的相应亲核试剂混合时快千亿倍[30]。不过脱酰化过程还不能模拟。尽管如此，这种有机分子催化剂已表现出和酶有同等效率的趋势。Cram 等正在作其它方面的探索(图见下页)。

5.2.7 对位环芳烷烃、聚冠醚及其它

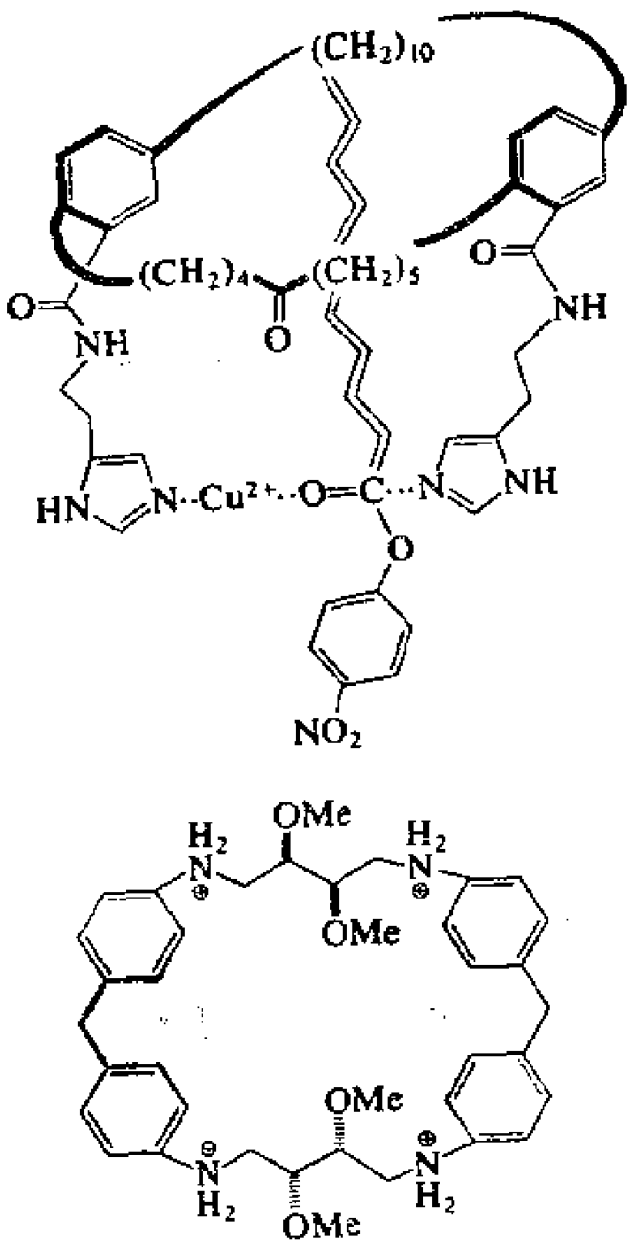
对位取代环芳烃是一种骨架全由碳和氢原子组成的大环分子。由于其内部孔穴具疏水性，因此用作酶模型时必须将其功能基化。例如下述分子将疏水结合部分和能与金属离子络合的咪唑基团合并，可催化酯的水解[31]。反应中形成一个酰化中间体，但并不易用水中分解脱出酰基。反应加速主要由于分子级数减少，它将一个二级反应转变为假一级反应过程。然而，其结果只是化学



计量而不是催化量的。

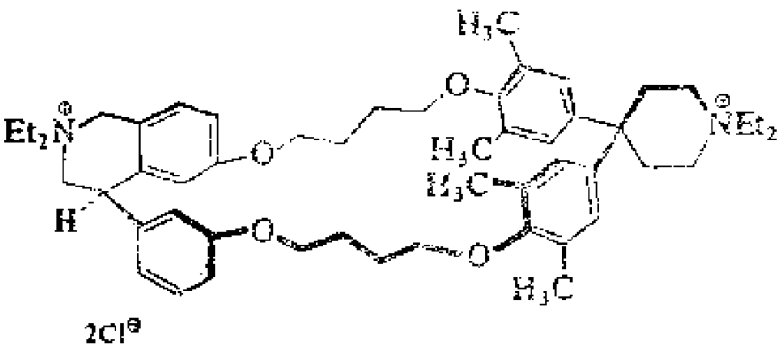
水溶性的环芳烃如果具有手性疏水孔穴时将有利于立体选择性识别。第一个手性环芳烷烃是由两分子二苯甲烷连接到由L-酒石酸形成的手性C_4链而成[32]。在水中，这种光学活性的对环芳烃可与小分子像扁桃酸、乳酸、苯丙氨酸等形成非对映光学异构体。

还有一种光学活性的大环宿主，分子中插入异喹啉环为手性骨架[33]。这种手性环芳烷烃在D_2O/CD_3OD为60/40的溶液中可与抗炎药萘普生形成非对映异构体的结合。

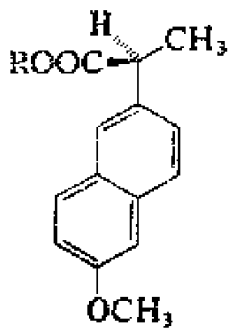


质子化形式

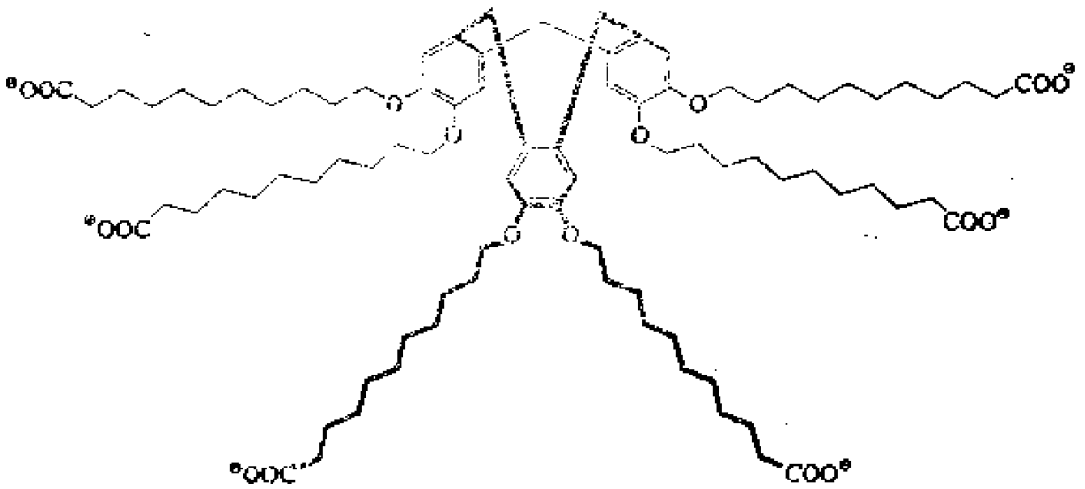
由环三藜芦基烃为原料合成了一种新的分子穴状物，它是带有六个触手状链的受体[34]。由于和章鱼相似，因此称它为六脚鱼。这种分子既有疏水骨架，又有具负电荷的长脂肪酸链，是新型的络合剂。当和对硝基酚酯结合时可以产生碱性催化的水解反应。这个分子具有柔性，又能将有机分子结合于孔穴之中。通过末端羧酸会聚而成有效的催化基团，这个模型化合物会成为酶分



(十)-异构体



萘普生的
S-异构体
R=H
R=CH_3



子引人入胜的模拟。

Stoddart 等发展了一种“分子带”化合物[35]，是通过双二烯与嗜双二烯之间反复的Diels-Alder反应形成的。在刚性环状分子外面对称地分布着六个氧原子。它可以把氯仿分子嵌入到这个分子成夹层状中。产生一系列这种由不同排布的骨架结构构成的带有楔形裂缝或凹槽的其他大环聚环化合物途径已经打开。

最后，我们还要介绍一类带有冠醚结构的聚合物，聚合物骨架可以由聚苯乙烯、多肽或多胺形成，相当多数的冠醚聚合物有

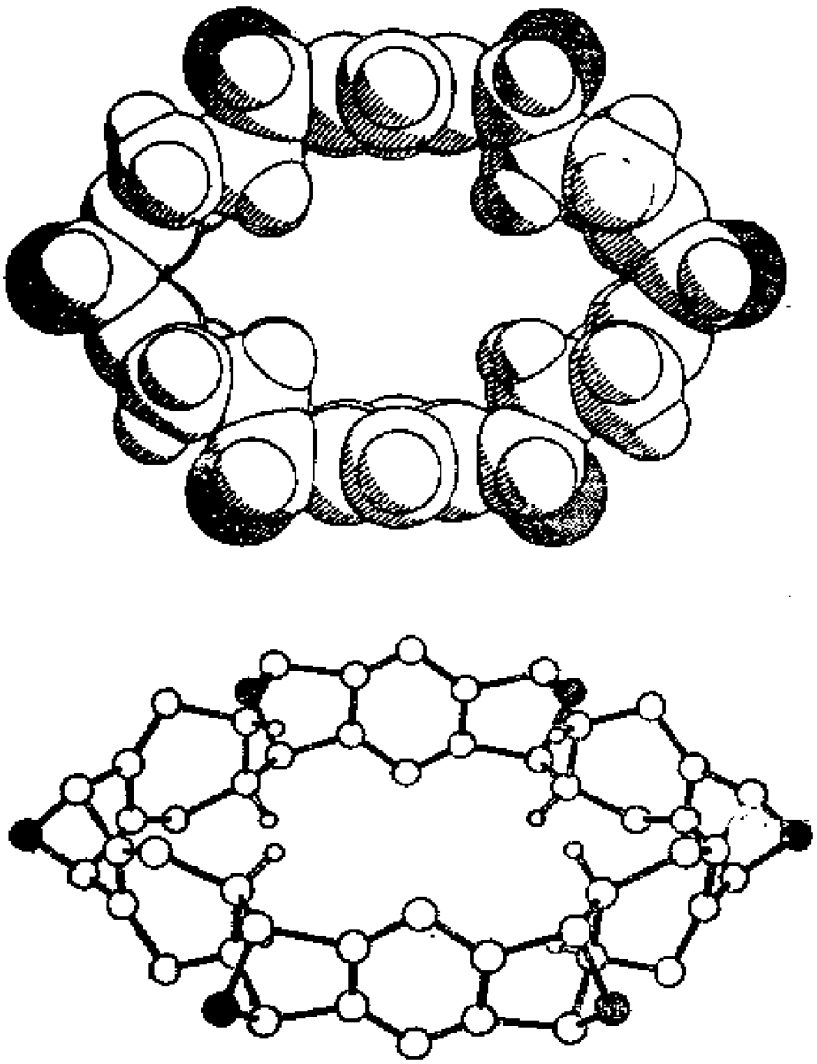
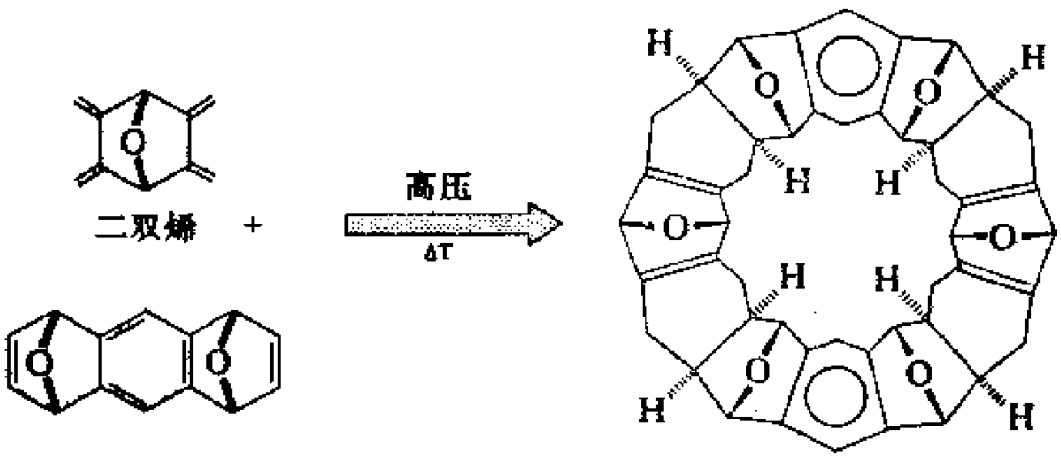
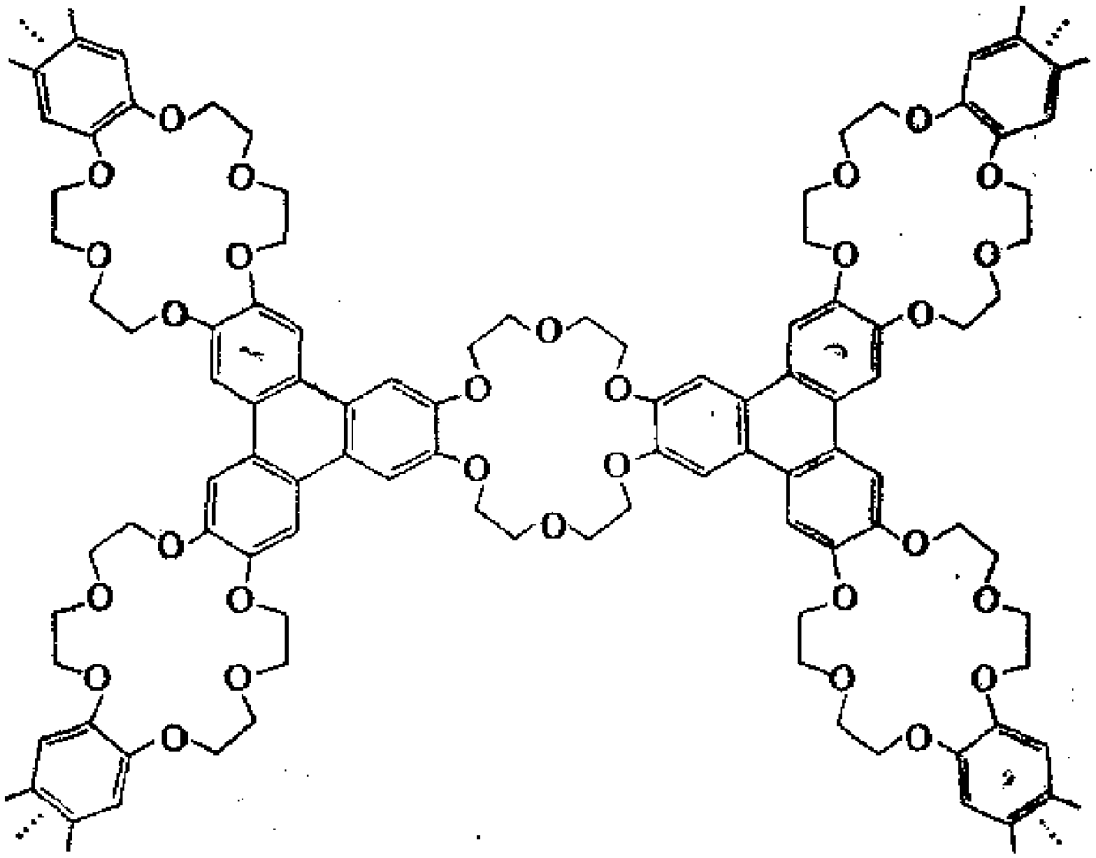


图5-12　Stoddart的"分子带"化合物的X-光衍射结构



效地用作离子选择性柱层析的树脂。

Simonet 发展了一类二维聚冠醚，它是由三（18-冠-6）亚苯基经电化学聚合而成。大量的这种平面大环有序地聚合可以形成使K^+能垂直通过的通道。这种结构可以模拟生物膜对离子的选择性通透。



聚三亚苯基冠醚

近来，Dye由冠醚以“三明治”的排布方式制成一种新型结晶化合物[36]，称作电笼（electrids），它能将电子捕捉于孔穴之中，而形成一种特殊的光学及电、磁性化合物。

5.3 膜化学和胶束

具有形形色色生物功能的脂质膜能够使分子选择进入的性质

与其两亲性有关。表面活性剂也是一种两亲性分子。在溶液中，单体浓度超过极限胶束浓度时，形成胶束（通常是在10^{-2}—10^{-4} mol/L），此时溶液电导有急剧变化。胶束是表面活性剂分子的聚集体，它可以有多种形式，但多数为球形。

图5-13是一个由十二烷基三甲铵的溴化物形成的球状胶束模型。它是由带正电荷的阳离子头形成表面，并将溴阴离子靠静电引力吸引在季铵离子附近。这个重要的区域叫胶束的Stern层，胶束的化学主要在这个区域发生。胶束的内部是类烃结构，只有少量水存在，它的内部和表面形成的极性差别使胶束与球蛋白非常相似。胶束表面的极性与蛋白质相近，介于水和醇之间。酶尽管从整体来看是水溶性的，但其活性部位却是非极性的，因而对胶束的研究很有意义。

已经知道某些非极性有机化合物可以进入胶束之内，因而可以较在纯水中溶解度增加。

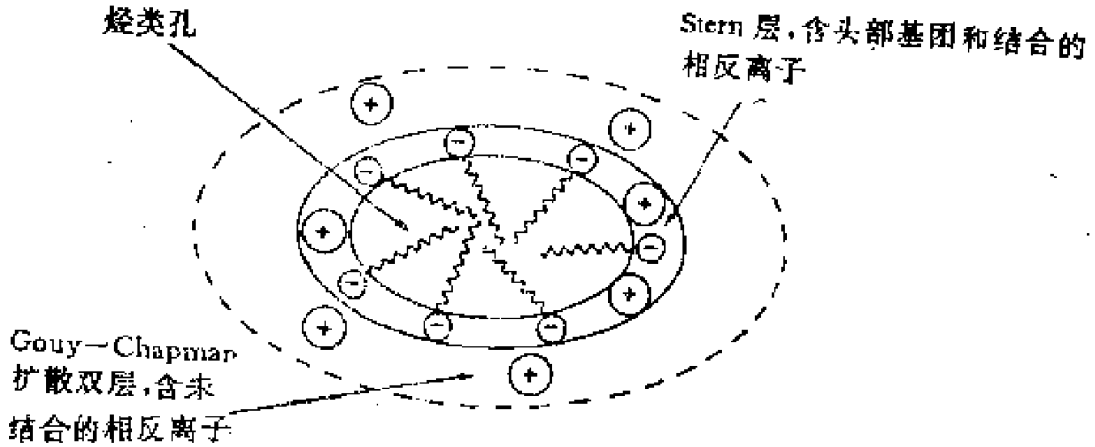
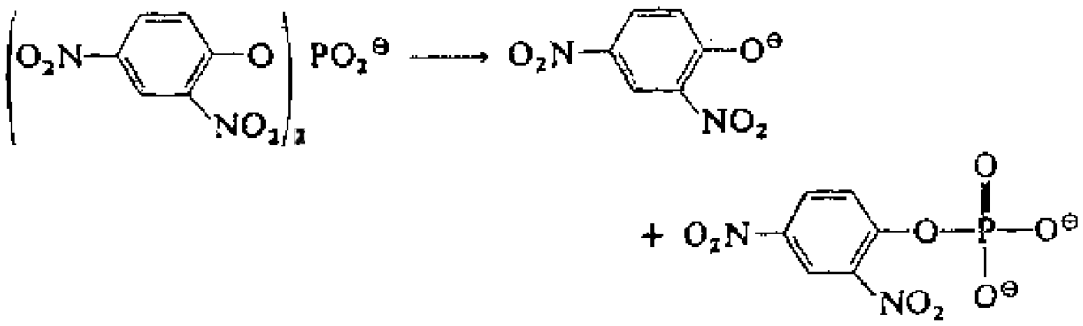


图5-13　离子胶束理想球形模型椭圆截面图

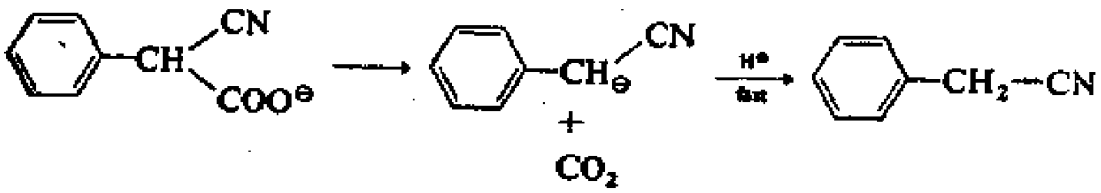
不仅如此，胶束还可改变有机化合物的化学活性，形成胶束的表面活性剂可以提高有机物的反应速率。依据使用的胶束类型，可以形成高浓度的H^+或OH^-聚集于Stern层中，从而在胶束类烃内部与Stern层的交界面处引起反应速率增加。胶束内部

的其它碱性或亲核基团对于催化作用也有影响。胶束表面向外延伸与相反的离子间藉助微弱静电引力形成宽阔些的高伊（Gouy-Chapman）电离扩散层。

在pH为8时，阳离子胶束可将二（2,4-二硝基苯基）磷酸酯快速水解。阴离子胶束将抑制此反应。因其与负电荷的产物会相互排斥，而且，也不利于通过静电作用将促进反应的OH^-离子聚集至Stern层中。

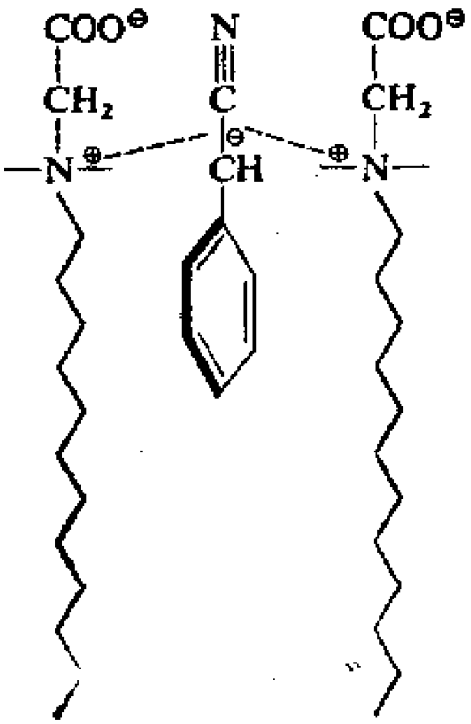


偶极离子胶束一般不起催化作用。但在下列反应中，由于库伦引力的结果可催化此脱羧反应[37]（参见下页上）。

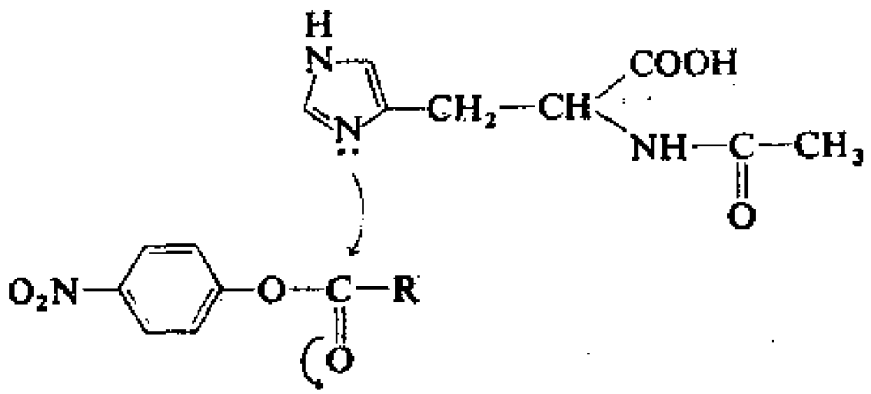


胶束系统内许多动力学特征与它的单层结构和表面的聚集电解质有关。十二烷基磺酸钠（SDS）这个熟知的表面活性剂，它可以形成含50—100个分子的球状胶束。其溶液和胶束相间的电位可达50—100mv，正因为电性作用及疏水性使胶束得以稳定。SDS可使蛋白变性，是由于蛋白质的三级结构中有类似的作用力。

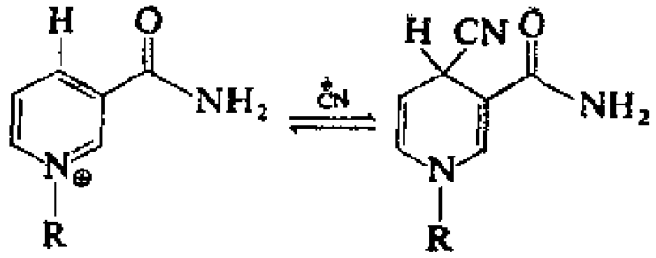
表面活性剂形成的胶束有时只是提供催化反应的介质，但不直接参与反应。例如N-乙酰组氨酸通过酰基咪唑中间体催化对



硝基苯酯的水解。咪唑环对于酯基的亲核力随着它进入胶束体系而增加，即当SDS存在时，胶束内形成高浓度催化剂和底物，有利于反应。



氰离子可和3-氨甲酰基-N-烃基吡啶进行加成反应。在这个反应中如果加入0.02M的十六烷基三甲铵，可将反应速度常数提高950倍，其结合常数可增加25000倍。在这个反应中，反应物转变为中性的产物，被定位于胶束内部。反应物与产物相比，疏水作用使后者更稳定。因此，表面活性剂的存在尤其有利于氰离子对



R = $C_{16}H_{33}$

底物的进攻。因为在胶束体系内反应物与产物的比值使反应平衡向右方移动。

还要提到的是反向胶束。磺化琥珀酸酯可以形成反向胶束，通过它可将显著数量的水插入到辛烷溶液中的胶束内（50mols水/mol溶质）。Menger在1973年引用了“水池”一词来描述反向胶束的内部孔穴[38]。使用0.10M的十二烷基铵的丙酸盐(DAP)可以在苯中形成反向胶束。Fendler利用这个系统，采用纳秒（ns）分辨荧光测量技术研究芘-1-羧酸的超速激发态质子转移。比较激发态的芘-1-羧酸在水和反向胶束形成的“水池”中质子转移速度，发现其羧酸根的质子化速度常数在反相胶束系统中要比在水中大得多。从图5-14可以看到一部分DAP水解生成丙酸并被拉入胶束形成的水池区域。质子转移在表面活性剂的水合壳上进行，供体与受体彼此相距很近。由于反向胶束能把反应物限定在一定环境中而达到缩小体积的目的，因而可以增加其反应常数。这种荧光探测是研究各类体系微环境的方法，其中芘-1-羧酸作为探针使用。本实验提供了一个说明在反应物被局限于适当环境如膜表面时，可以催化质子快速转移的模型。

胶束系统如果带有催化基团时，催化作用将更明显。例如，对于N-十二碳酰基-N′，N′-二甲氨乙基的碳酸酯盐，使用下列具有长脂肪链酰基组氨酸的表面活性剂比使用N-乙酰基组氨酸要快2240倍。

带有半胱氨酸的长链烃，当浓度为0.003mol/L和0.005mol/L时可以形成胶束。此时它对于对硝基酚乙酸的酯水解作

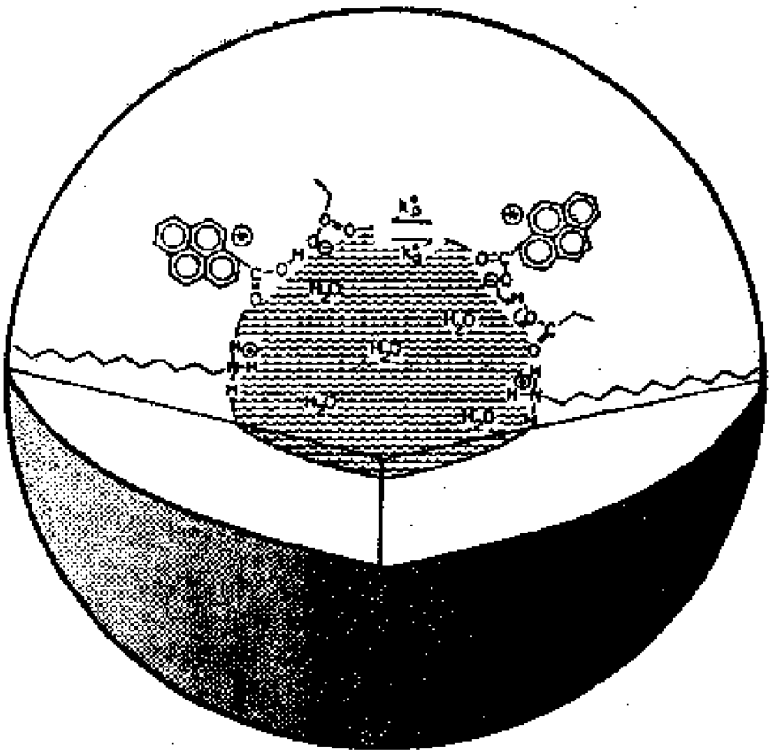
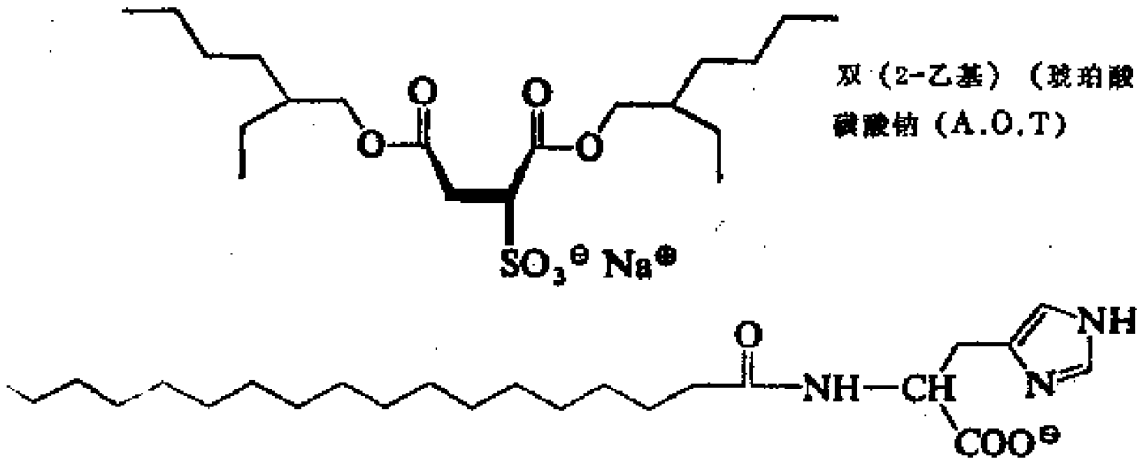
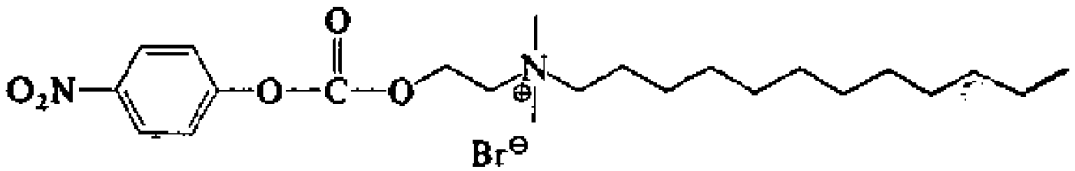


图5-14　反向胶束"水池"中的质子超速转移模型

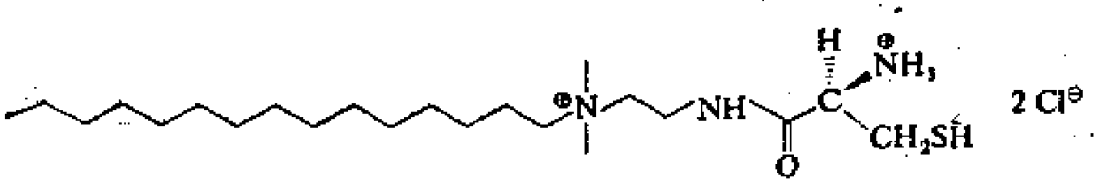


催化剂(N-酰基组氨酸)

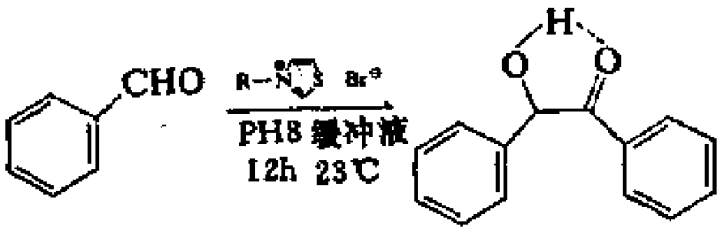


底物(碳酸酯)

用比无功能基存在的十六烷烃三甲铵氯化物形成的胶束活度要大180倍。



N-十二烷基溴化噻唑鎓盐可以催化安息香缩合反应。此时由于形成胶束，苯甲醛分子插入其中，收率可达95%。而R为丁基时，上述反应并不发生[39]。



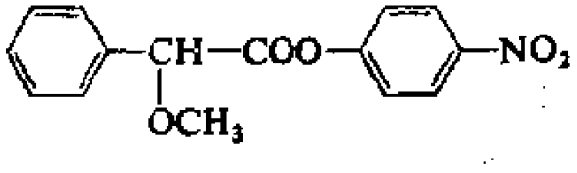
总之：当反应物能插入到胶束中因而增加了它的有效浓度；同时，由于提供良好介质减少了过渡态时熵的损失，因而可起到催化效果。胶束系统的有利之处在于疏水作用的增加，可一定程度上模拟酶或膜的作用、具有与维系蛋白质三级结构相近的各种力、可以增加有催化能力的离子的局部浓度等。通常可以看到上千倍反应速度的增大。

不过胶束只能作为较粗的酶模型，因为胶束无确定的结构，缺乏刚性及定位作用。而且胶束的结构受到表面活性剂浓度的影响。

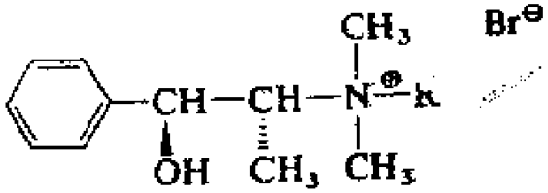
5.3.1 立体化学识别

目前对于应用有光学活性的表面活性剂生成的胶束进行手性底物催化反应尚不多见。曾经研究过由D-麻黄碱类似物衍生的阳离子表面活性剂对于D-和L-扁桃酸对硝基酚酯的选择性水解催化作用。这个手性胶束表现出对于D-扁桃酸酯的水解具有

较大的催化活性。释放出来的对硝基酚可用光谱追踪。实验条件是25℃、pH＝9、0.0imol/L硼酸缓冲液中加入0.5% 二氧六环；底物浓度为10^{3}mol/L，结果如图5-15所示。



DL-扁桃酸酯



D(—)-表面活性剂
R＝($C_{16}H_{21}$—$C_{18}H_{35}$)

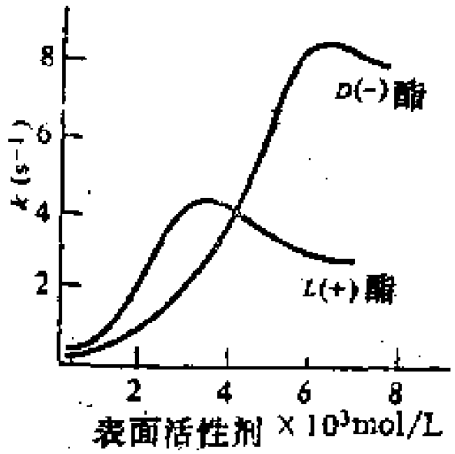
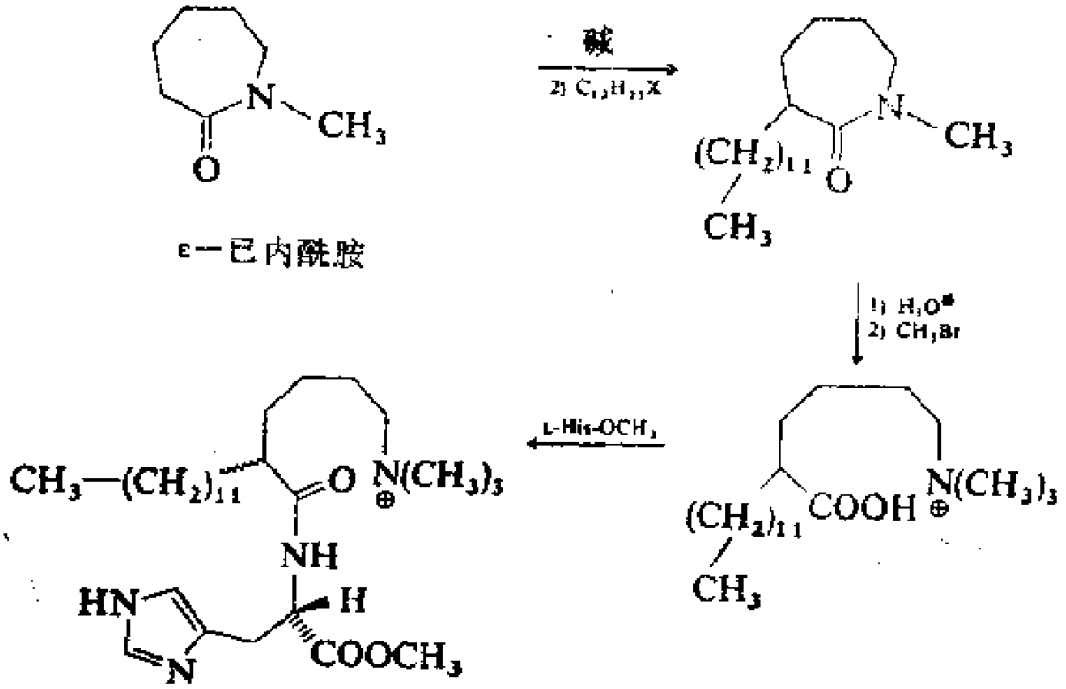


图5-15 用手性胶束选择性水解扁桃酸酯

另外一个例子是由 Zunton 应用光学活性的L-组氨酸基阳离子胶束，它对于氨基酸衍生物的水解有较大的立体选择性[40]。此胶束通过下述途径得到：以上得到的胶束在 0.02mol/L 的磷酸缓冲液，pH＝7.4条件下水解N-乙酰基苯丙氨酸酯时有较好的选择性。S-异构体能较快地进行脱酰化反应，与R-异构体的速率比为 3:1。胶束对于两个异构体的结合常数是相同的。因此，反应速率之不同可能是由于对映体的氨基酸酯之间在过渡态时ΔG不同的结果。由图5-16(a)可见起始的反应速度相同，这说明立体选择性与过渡态有关而与其反应物起始状态无关。如果加入十六烷基铵盐作为竞争性表面活性剂时，选择性下降。看来，存在

于胶束中的功能基—咪唑基与立体选择性有关。手性胶束和S-



异构体形成的过渡态可以假设如下（图5-16b）；显然，当R-异构体结合时将产生咪唑环与苯环的排斥作用。

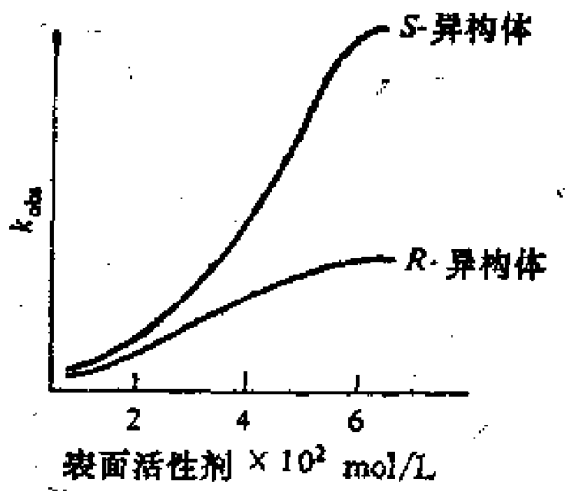


图5-16 α,N-乙酰基苯丙氨酸酯由L-组氨基阳离子胶束选择性水解

此外，胶束系统在药物学上可用于乳液聚合。合成化学家则用来进行相转移催化。

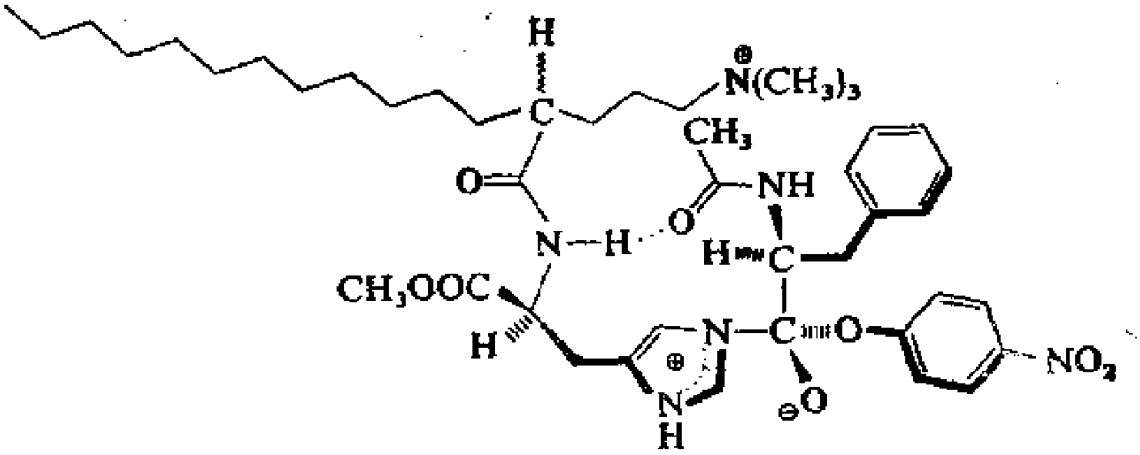


图5-16 b．手性胶束与S-异构体形成过渡态的模型

5.3.2 膜模拟的进展

多年来用平面双脂层或脂类泡囊形成人工膜系统以研究离子载体或离子通道的生物离子运输过程是生物有机化学关心的问题之一[41]。在这方面已经发展了许多良好的体系。例如一种在聚合的表面活性剂内，嵌入一个半导体小囊。将带有氧化、还原活性基团的表面活性剂超声处理，形成的双层经幅射可形成跨膜聚合小囊。这个小囊由于具有氧化还原基团，可将水分解为组成成份H_2和O_2。其模型如图5-17[42]：

许多其它类型的聚脂，例如由合成肽形成的球状聚体，由与冠醚相连的脂链形成的片状或棒状聚体，此外还有在两端均有亲水头基团的两亲体分子如bolaamphiphiles。这类分子用于形不成对称的多孔膜，是制备电荷分离体系的开端(见212页)。

有一种合成的跨膜双极性磷脂，在它的疏水部位装配有分子探针[43]。各种光亲合标记或自旋标记的探针可用来研究脂膜活度及药物和离子的运输。

Lehn 等[78]介绍了一种“分子线”的合成，其中一个叫作 Caroviologens 类的化合物是将类胡萝卜素和1,1′二烃基，4,4二吡啶和(Viologens)结合而成，例如下列双吡啶聚烯：这种结构可以插入到膜中形成一种跨膜电子通道。其分子长度可以跨越

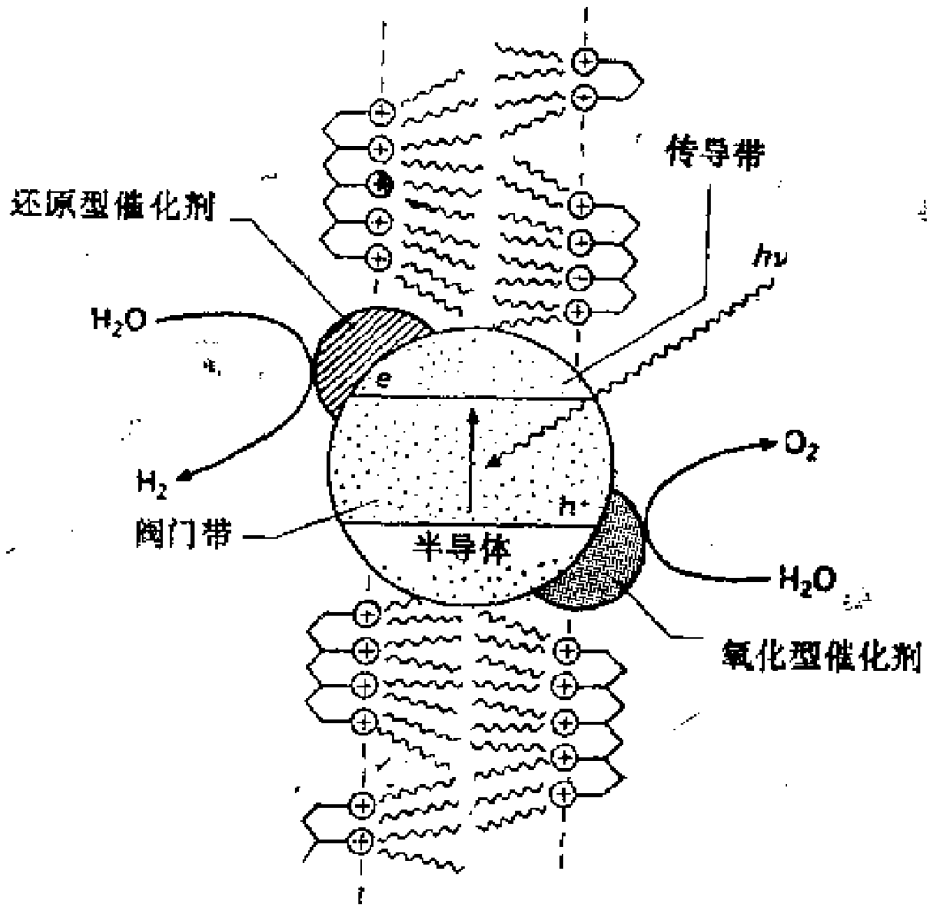
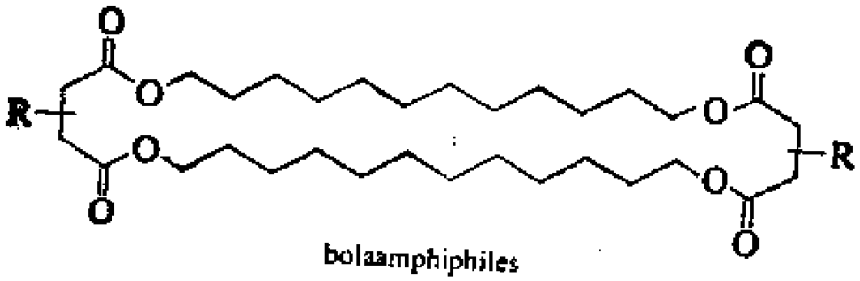


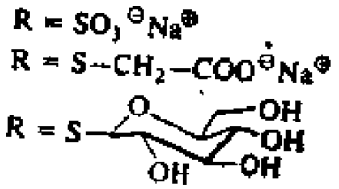
图5-17　在半导体膜的聚合膜上进行水分解的示意图

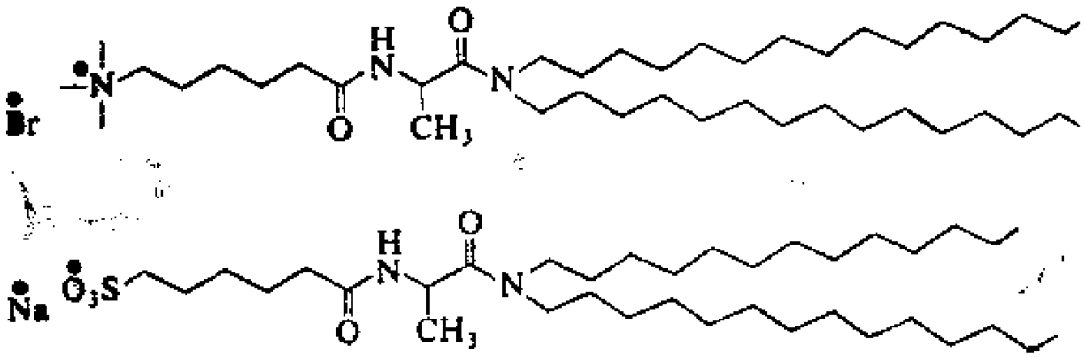
高聚物囊
横切面

双层膜，吡啶部位与双-十六烷基磷酸酯球囊的内外表面的负电荷接近。原则上，这种可移动的具有氧化还原活性的分子两端可由氧化还原基团如醌组成，它可以在膜的一侧接受电子被还原，然后再经过载体分子的聚烯骨架转移到另一侧(图5-18)。

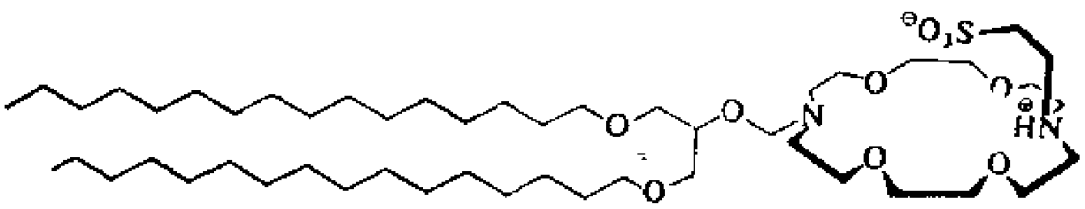


bolaamphiphiles





两种类脂等摩尔的混合物分散在水中形成球状聚集体



有阴离子盖的冠醚环

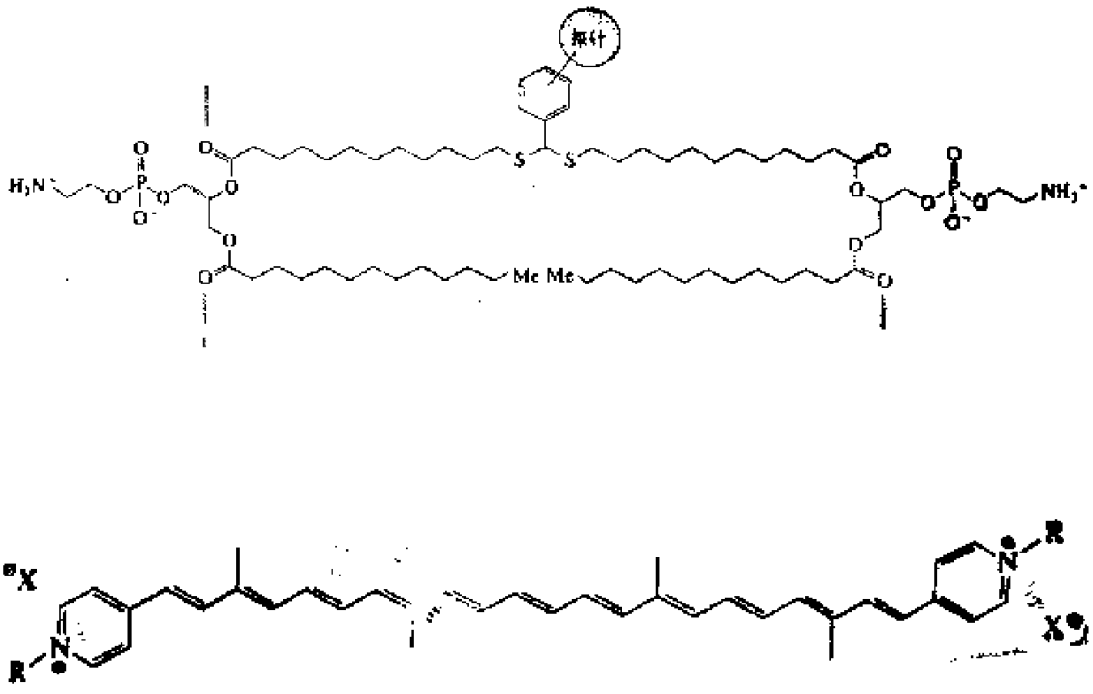


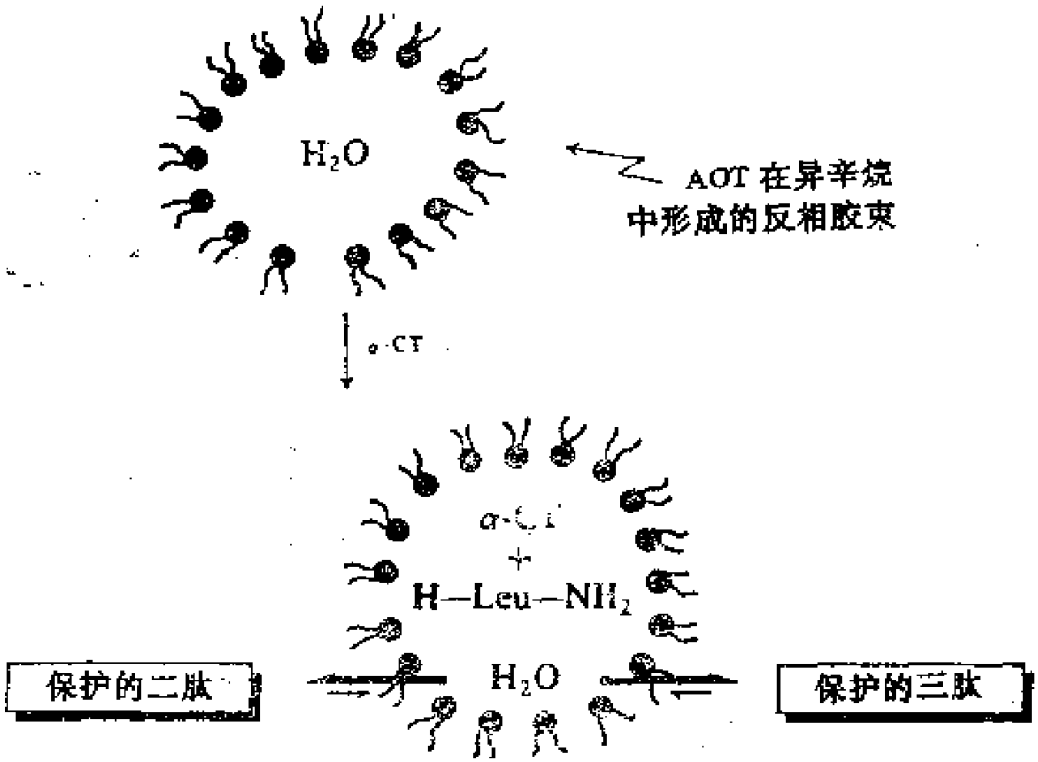
图5-18　作为电子跨膜通道的分子线

有关这一领域还有许多新的进展。最后我们介绍在反向胶束中溶解的酶进行肽的催化合成的例子[45]。由阴离子表面活剂性双（2-乙已基）琥珀酸磺酸钠(A．O．T）所形成的反向胶束可以看成一个微反应器，但它的物理性质可以由周围环境调节。另外

由于它具有极性核心和疏水的外表面，利用这种差别，将α-糜蛋白酶溶在其中以进行肽的合成。不溶性的三肽合成之后被逐出反相胶束。三肽形成率可达40～60%。

$$\text{Cbz-Ala-Phe-OMe} + \text{H-Leu-NH}_2 \xrightleftharpoons{\alpha\text{-CT}} \text{Cbz-Ala-Phe-Leu-NH}_2 + \text{MeOH}$$

水不溶的二肽　　可溶于水的氨基酸　　水不溶的三肽

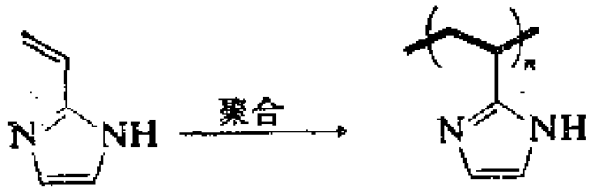


Whitesides等发展了一项新技术，将酶封在纤维醋酸酯透析膜中进行反应。可以采用的酶促反应很多，使用时将含酶的袋浸入到水/已烷两相系统的水相之中。反应在透析袋内水相发生，然后转入有机相。酶与有机相不接触可防止失活，并可回收再用。这种由膜包容的酶催化技术（MEEC）比固定化酶的应用更为简便，酶的失活程度更少。

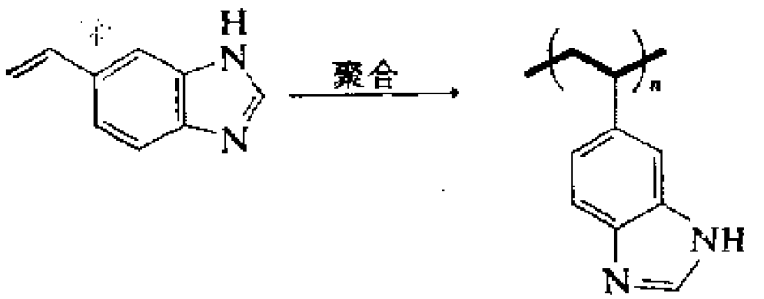
5.4 聚合物

酶是氨基酸单体的聚合物，因此用合成的高聚物改善低分子

量物质的活性很受重视，带有电荷及催化基团的高聚物可起催化剂的作用。本节将介绍含有咪唑环的聚合物对于对硝基苯酚酯所显示的催化水解作用。1965 年C. G. Overberger 等[46]指出了由咪唑乙烯和苯并咪唑乙烯聚合生成的聚合物较其单体具有较大的催化能力。图 5-19 说明了对硝基苯酚乙酸酯(PNPA)在 28% EtOH-H_2O溶剂中有咪唑或聚乙烯咪唑存在时的溶剂化反 应。α值表示在中性及非离子化时功能基在总量中的比例。当 pH 较低时，咪唑基质子化，α值很小。显然，低α值的咪唑环不能参



聚乙烯咪唑



聚乙烯基苯并咪唑

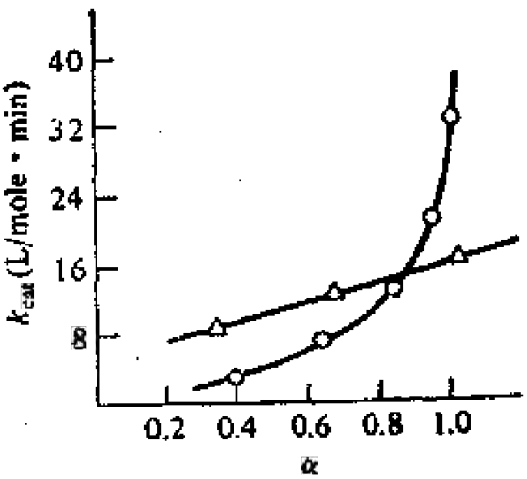


图5-19 PNPA催化溶剂解(○)聚乙烯咪唑(△)咪唑
28.5%乙醇-水，26℃，离子强度0.02

预催化反应。由曲线看出α＜0.8时，聚合物比咪唑本身只有较小的催化效果。而当α＞0.8时，催化效果较好。咪唑形成阴离子的pKa值为14，但很难在这种强碱性中研究催化反应，因碱本身起了显著的催化作用。聚乙烯苯骈咪唑pKa在12.2，用这个聚合物研究收到较好的效果。

使用阴离子底物，如4-乙酰氧基-3-硝基苯甲酸(NABA)和4-乙酰氧基-3-硝基苯磺酸（NABS），聚乙烯咪唑对它们的催化溶剂解结果如图5-20所示，两个底物催化曲线均为抛物线状，它们的最大催化活性均在α＝0.75，即中性咪唑基在聚乙烯咪唑

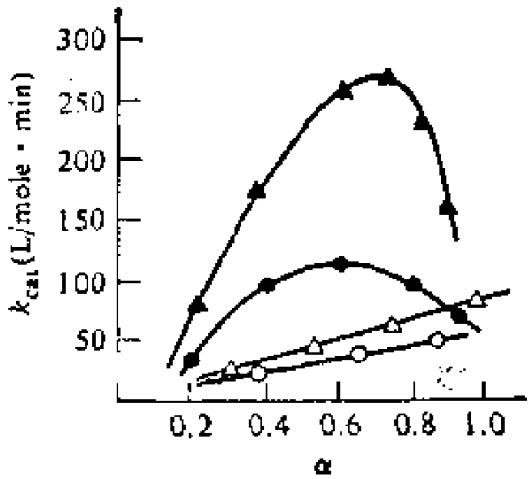
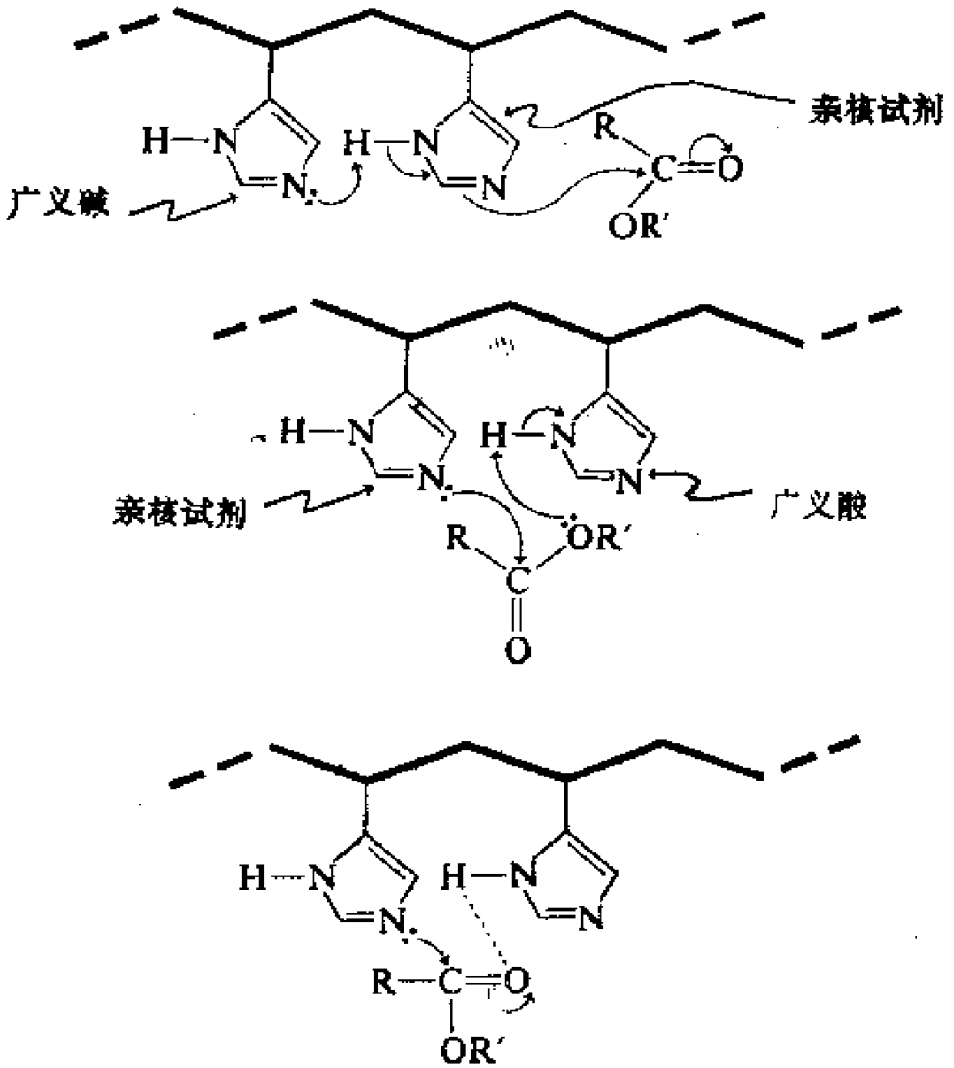


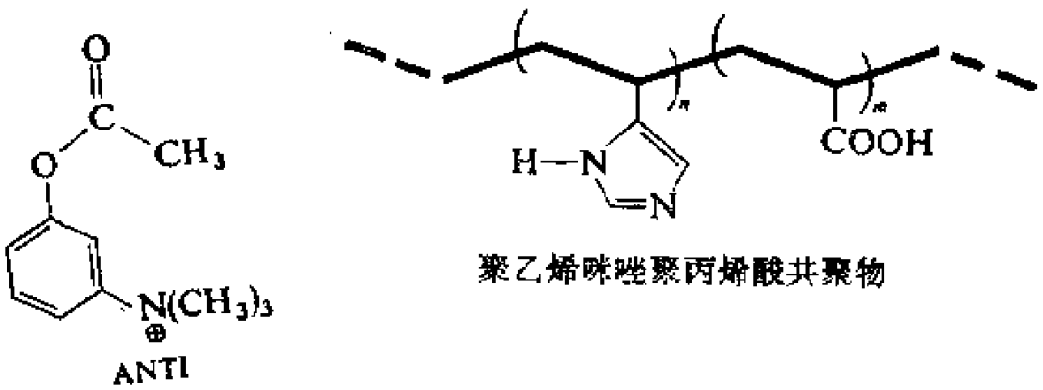
图5-20　被聚乙烯咪唑催化的
NABA和NABS的溶剂解●▲聚乙烯咪唑△○咪唑；
28.5%乙醇-水，26℃，离子强度0.02

中占75%处。其中25%的阳离子型咪唑用在与底物结合上；而中性咪唑仍然是其催化酯水解的活性基团。底物和催化剂的作用之间可以用三种机制描述：一种是广义碱催化的亲核进攻，但这是在低 pH 值下不可能的。第二种是广义酸催化的亲核反应，但是由于酯基中的 RO^- 还不足以使咪唑脱质子化，所以也不太可能。第三种则是通过稳定的四面体中间体的机制。当然目前还没有证据否定哪种机制，不过解释其催化作用时要考虑两个因素：当咪唑质子化时，聚合物与底物疏水作用减少，但对带相反电荷底物的作用增强；另外，如果生成多离子的聚合物，由于电荷相

互排斥会导致更加延伸的构象，此时将不利于两个咪唑环间的协同作用。实际上有效的催化与两个唑咪环协同作用有关。除了上述离子化因素外，极性溶剂如水有利于使咪唑环协同生效。实际上其催化常数在水中比在含30%乙醇的醇水混合物中要大。



合成的共聚物也显出与酶相似的催化能力。例如由聚乙烯咪唑和聚丙烯酸形成的共聚物可以催化 3-乙酰氧基-N三甲基苯铵碘化物的溶剂解。图5-21说明，当共聚物中只有咪唑基含量适中时才表现出有效的催化作用。这是因为羧基阴离子既是催化必要基团，又不能过分集中以防止生成聚阴离子。这种共聚物对于荷电底物的选择催化显然与其所含阴离子的静电引力有关。它同时



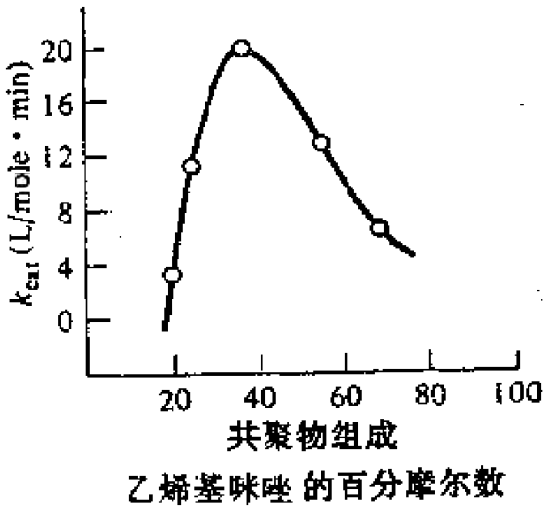


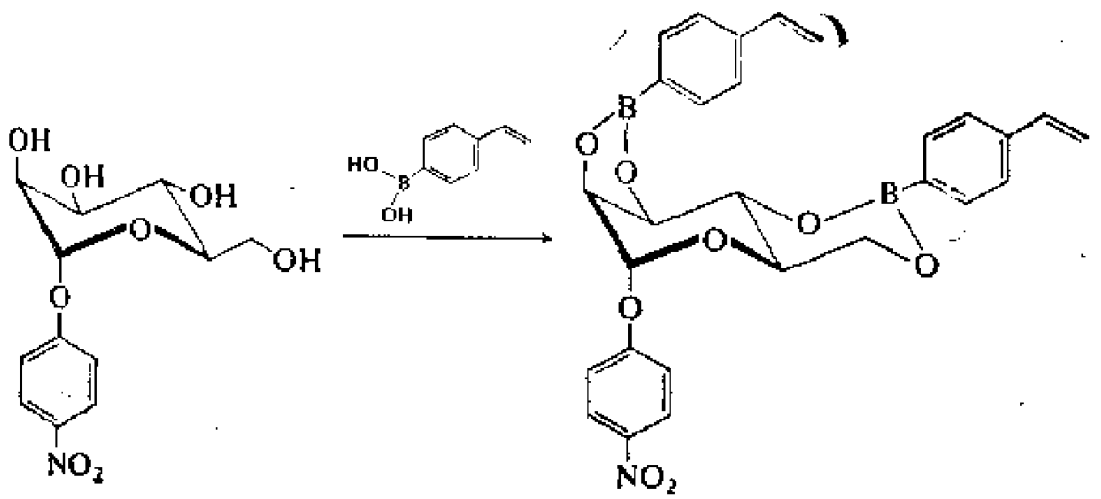
图5-21　由乙烯咪唑和丙烯酸共聚物催化的ANTI的溶剂解

pH＝9，28%乙醇-水，离子强度0.02 25℃

也使底物周围汇集高浓度的咪唑亲核试剂。这个类型聚合物与催化水解乙酰胆碱的乙酰胆碱酯酶可起同样作用。

Wuff等用“模板合成技术”，利用D-甘露糖为模板制得的树脂，可部分地拆解消旋的甘露糖。树脂是先经硝基苯酚基-α-D-甘露糖苷与4-硼酸苯乙烯酯化制得模板分子，然后，此模板分子进一步与乙烯丙烯酸二甲酯共聚制得。此共聚物树脂经碱性水解可除去D-甘露糖，但保留了与D-甘露糖互补的生物模拟孔穴，此孔穴还保存固定在手性环境中的硼酸。由于此水解后共聚物仍保存了对原模板分子的“分子记忆”，因而可识别D-甘露糖。当将消

旋的甘露糖溶液与此树脂反应时，溶液中可得到 13% 的 L-甘露糖，树脂上结合 40% D-甘露糖．达到了部分拆解消旋甘露糖的目的。此种手性识别类似于抗原与抗体间的识别关系。



α-D-甘露糖

共聚作用

$OH^{\ominus}$

释放甘露糖，产生与D甘露糖互补的仿生孔穴

高聚物酶模型还将继续发展。总的说来，带有功能基的高聚物由于可以使催化基团在骨架上有足够浓度，可以具有疏水结合的侧链，以及静电结合的荷电部位，因此可以模拟酶的催化功能。其不利的地方是溶解度小，聚合键排布无序、及多个活性部位，因此与酶尚有区别。

5.5 环糊精

α-环糊精是由六个葡萄糖组成的天然宿主分子。是以葡萄糖间1α-4头尾相连形成的一种环状淀粉结构。在分子外部有分别

来自于C_2，C_3及C_6的羟基，因而有亲水性。穴内则由C-C，C-H，C-O键组成，具疏水性。此情况正与冠醚相反。环糊精可以和多种客体分子形成结晶状包容复合物。客体的大小对于复合物形成十分重要。α 环糊精孔穴的内径是 0.45nm。苯环体积小，可以进入含6 、7-、8-个葡萄糖的环糊精；但萘环只能进入8个葡萄糖的环糊精。7个葡萄糖的环状物称为β-环糊精。疏水键、氢键、范德华力在复合物形成中均起作用。

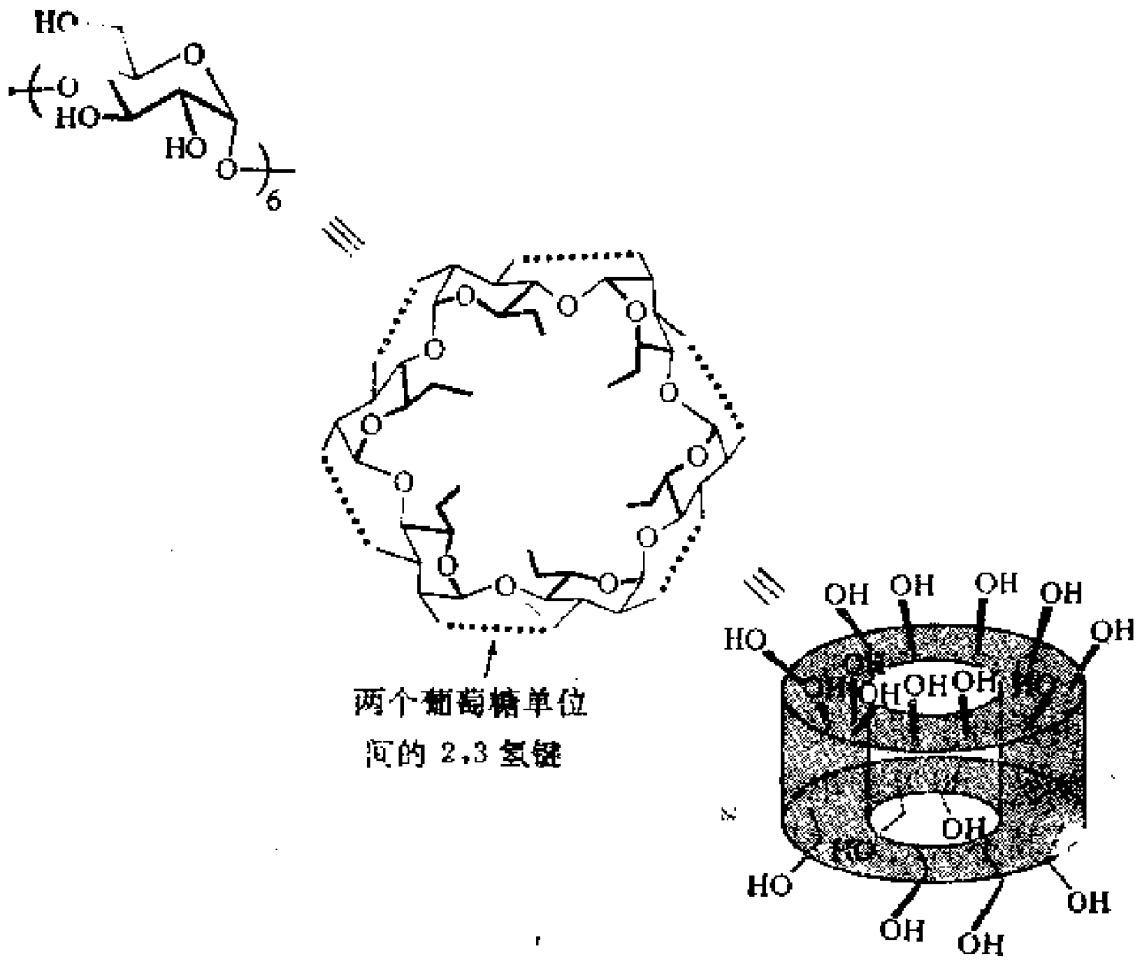
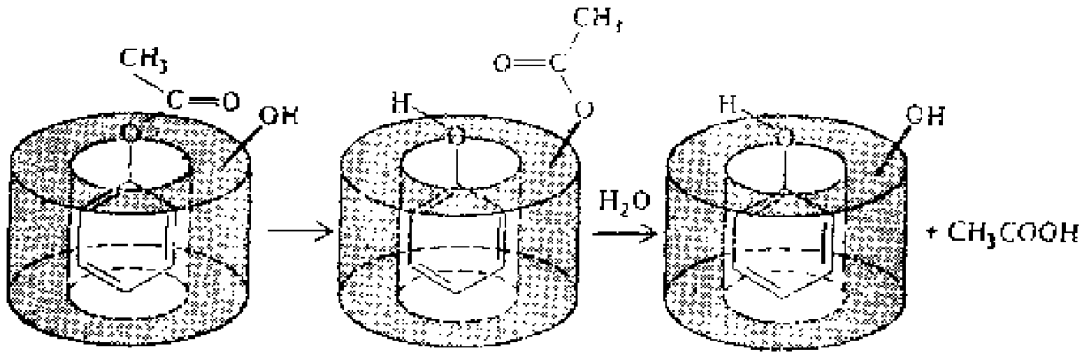


图5-22　α-环糊精的结构

关于环糊精用于生物模拟化学方面所作的工作很多。Breslow 首先注意到一些芳香烃的取代反应可在环糊精分子内选择性地进行。例如苯甲醚在次氯酸中的氯化反应[47]。与此相似，

芳香酯可被环糊精快速催化水解。反应时，羟基参与了反应，酰基被转移至宿主分子内，其过程与水解酶相近。



Bender[48]等研究了在2-苯基咪唑醋酸和α 环糊精存在时，间叔丁基苯酚醋酸酯的水解反应，目的是了解丝氨酸蛋白酶机理中的电荷中继系统。结果，当底物与环糊精形成复合物之后，酯的分解速率可以增加12倍。尽管，在这个体系中的咪唑环、羧基、烷氧基与丝氨酸蛋白酶分子明显不同，但在酶与底物结合方面有相似之处。

当环糊精与底物结合时一个主要的问题是空穴内疏水性不够强，以及由于分子两端是开放的，因此复合物解离常数比酶分子的要大，对底物的固定化不很理想，常常需用高浓度的环糊精。加之，底物的低能量构象未必是最适催化能力所需要的。为了克服上述困难，Breslow[49]制备了一些连有其它基团的β-环糊精（直径为0.7nm空穴的环庚直链淀粉）如图5-23。

这样形成的环糊精分子底部被疏水基团盖住，穴变得浅而且疏水。曾经研究了它们与取代的苯酚醋酸酯之间的解离常数和水解速率常数，结果表明反应符合米式动力学。这些有“盖”的环糊精均可使反应速率增加。反应是与使用OH^-催化水解进行对比。不过，连有叔丁基的底物解离常数又急剧下降，这是由于叔丁基导致底物充满空穴，因此形成牢固的结合(表5-1)。

Breslow 等[50]还合成了β-环糊精基二咪唑分子用以模拟核糖核酸酶A，用它水解叔丁基邻苯二酚衍生物的环磷酸酯。由于

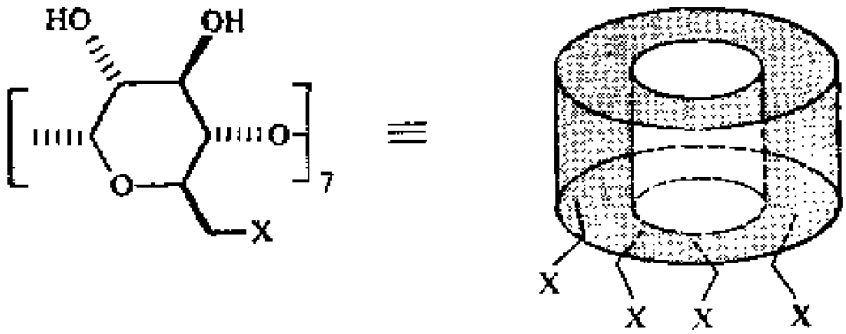


图5-23　带盖的环糊精分子的制备

环-5-5　-OH

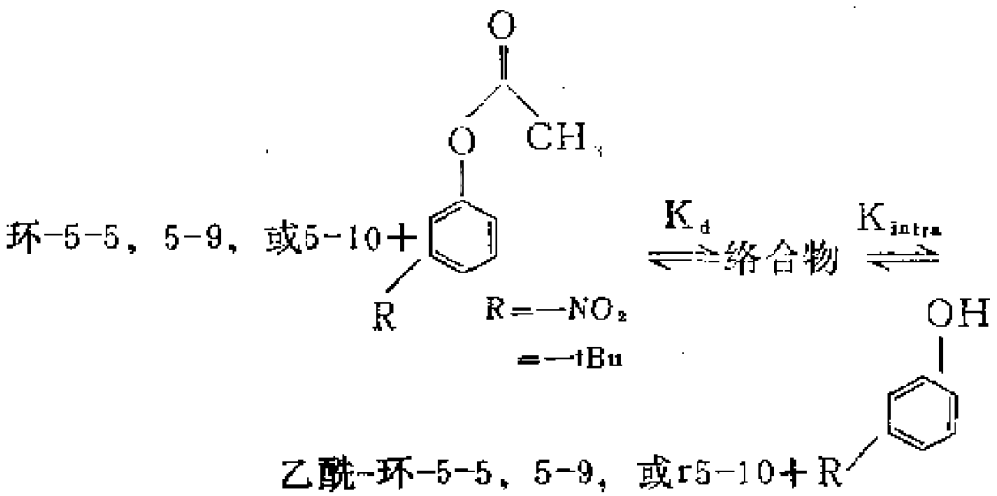
环-5-6　-OTs

环-5-7　$-NHCH_3$

环-5-8　$-NHCH_2CH_3$

环-5-9　$-N\begin{matrix}CHO\\CH_3\end{matrix}$

环-5-10　$-N\begin{matrix}CHO\\CH_2CH_3\end{matrix}$



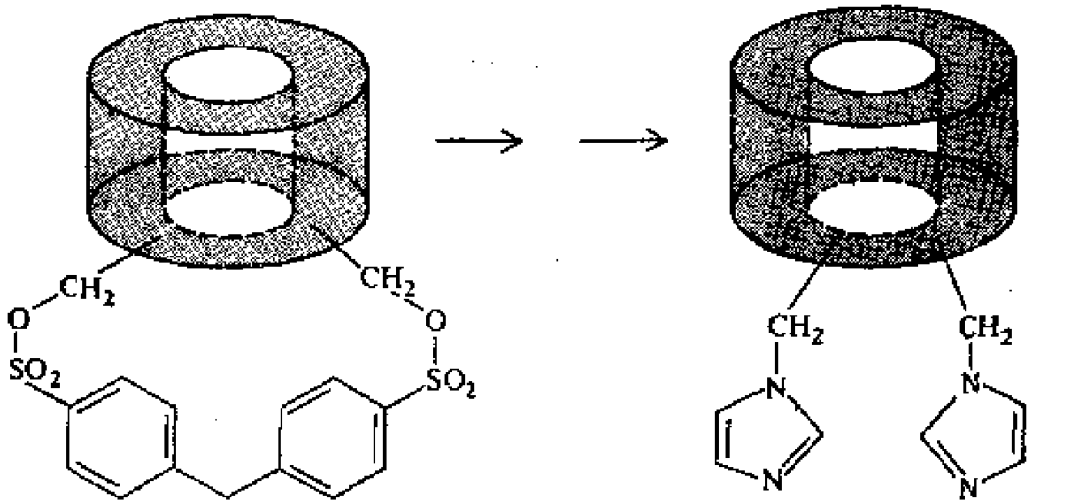
中性的咪唑及其离子的协同作用，可以选择性地水解，只得m-磷酸酯异构体，这是化学水解不具备的特征。反应只及 RNase 的 1/17，但与酶有近似的机理。

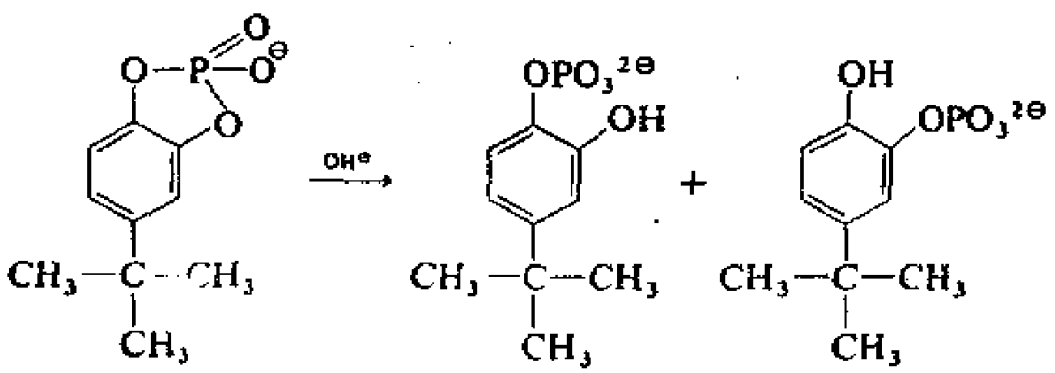
Breslow和Overman[51]发展了另一类模型，将金属离子引入到环糊精-底物复合物中。这种新型复合物的制备方法和作用方式如224页图示：

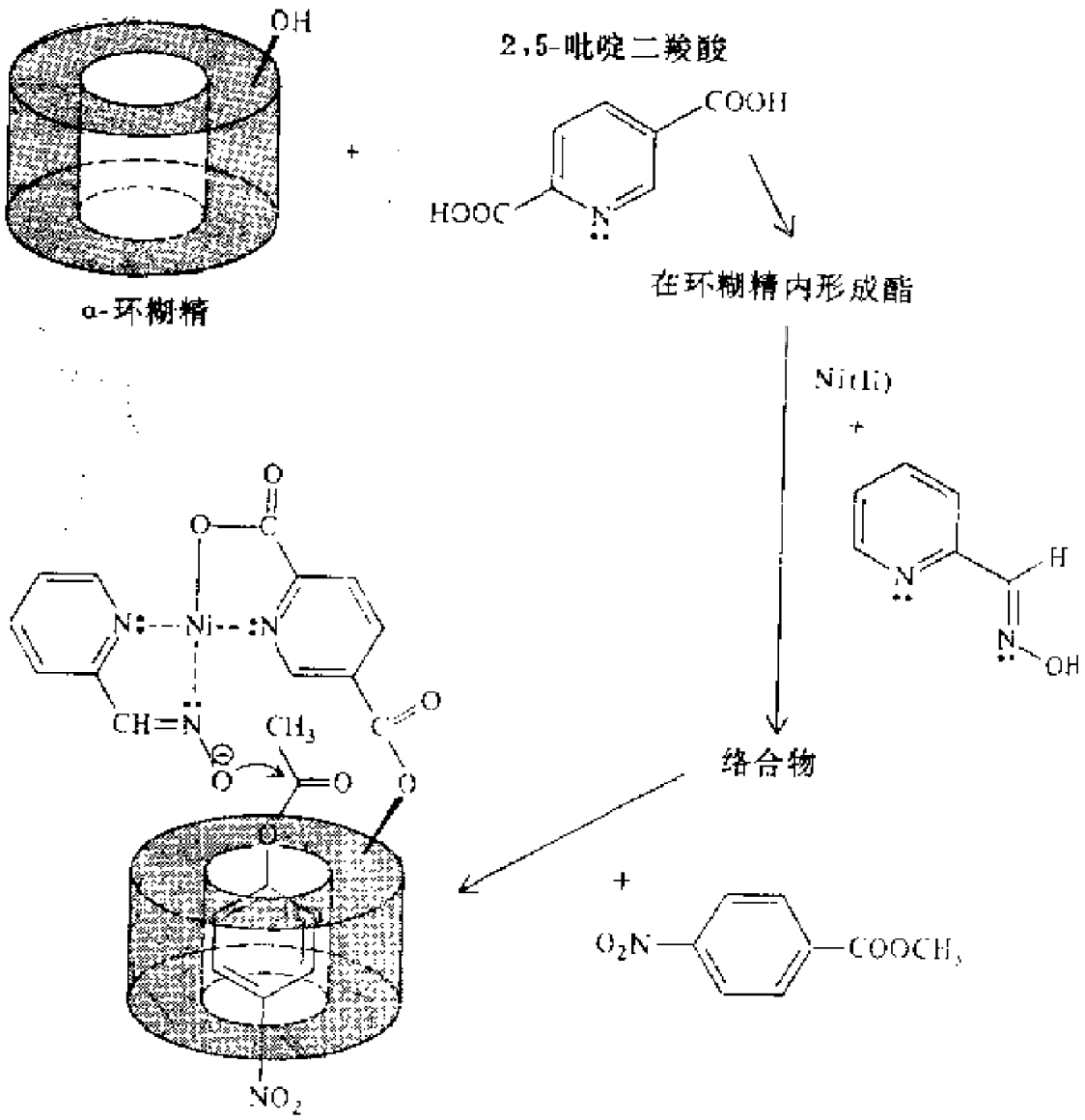
表5-1　β-环糊精衍生物对m-硝基和m-第三丁基苯酚醋酸酯的假化水解的速率常数和解离常数

底物 R	环	10^5K_{intra} (s^{-1})	K_{intra}/K_{OH}	10^4K_d(mol/L)
$-NO_2$	5-5	11.9 ± 0.05	64	57 ± 7
$-NO_2$	5-6	123 ± 5	660	51 ± 7
$-NO_2$	5-10	210 ± 40	1140	260 ± 50
$-tBu$	5-5	4.13 ± 0.25	365	1.9 ± 0.2
$-tBu$	5-10	37 ± 5	3300	4.6 ± 0.9

K_{OH^-}=用OH^-催化水解时速率常数，K_{intra}=用β-环糊精衍生物时的速率常数，Kd=解离常数







当用这个分子水解对硝基酚乙酸酯时，可提高反应速率1000倍。这是由于环糊精的孔穴固定住酯的分子，而金属离子又可将其它进攻基团定位，使之利于反应的结果。这种有效的催化体系更接近于酶的特征。

Knowles等[62a,b]于1979年报道了一种具良好性能的多功能化α-环糊精，其合成方法如图5-24(a)。在环糊精的一侧进行功能基化，另一侧引入各种可能的功能基。复合功能基化的宿主分

子可以互补地与客体分子结合。图5-24(b)表现了苄基磷酸酯在该分子内的结合作用。将宿主分子的铵盐电位滴定，得到的pKa值分别为7.42、8.02和8.79。这表明该分子中的伯铵盐解离度不

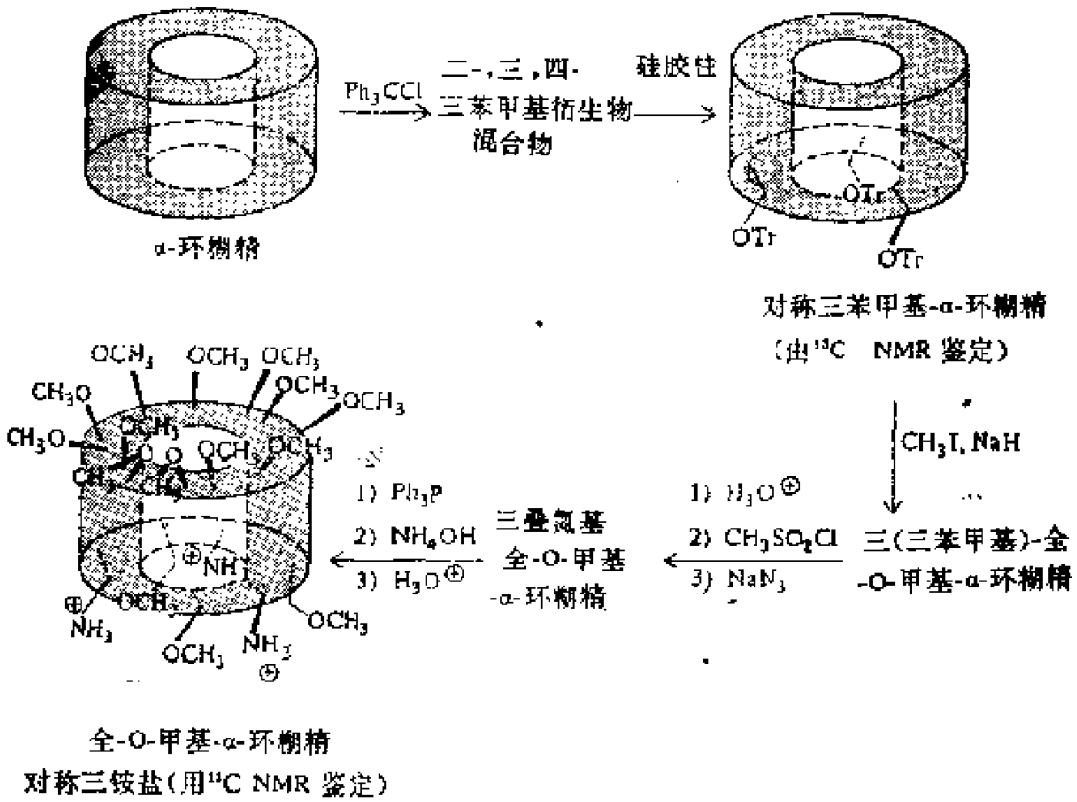


图5-24 (a)全-O-甲基化-α-环糊精对称三铵盐的制备

大，反映分子内极性也很低。当pH≈7时，宿主分子主要为质子化的形式，其与苄基磷酸酯的结合物的解离常数是0.031 mmol/L，与苄醇复合物的解离常数是24.3mmol/L，前者要小三个数量级，足以说明该宿主分子具有对苄基磷酸酯的选择性结合。这种结合与pH有关，说明客体分子磷酸根中的氧原子是与三个对称排布的铵离子间的作用。无机磷酸酯不显示结合作用，再次说明宿主与客体间疏水结合十分重要。这个宿主-客体把电性

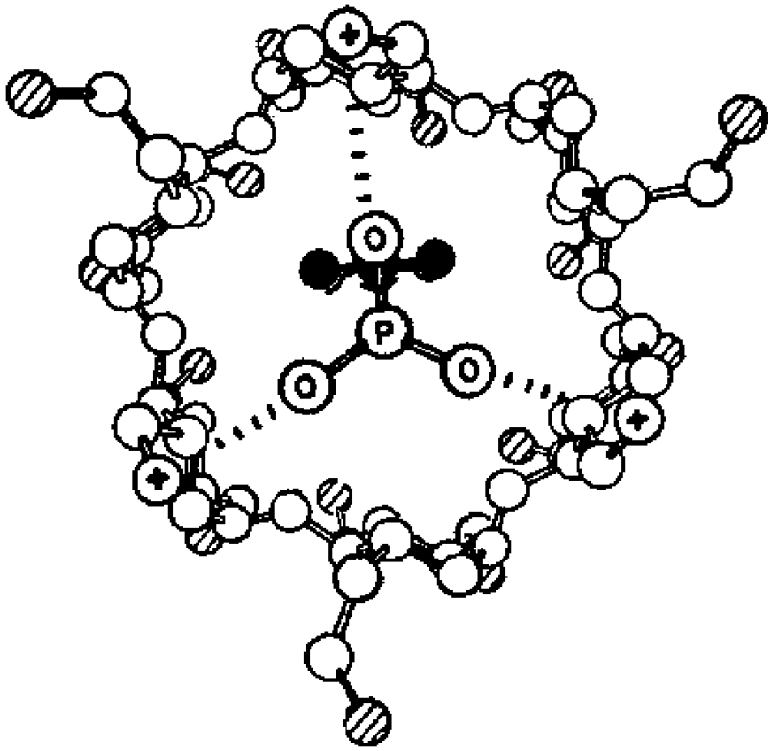


图5-24 (b)全-O-甲基化α-环糊精对称三铵盐与苄基磷酸酯的络合图

⊕为铵离子；15个甲基均带斜纹。

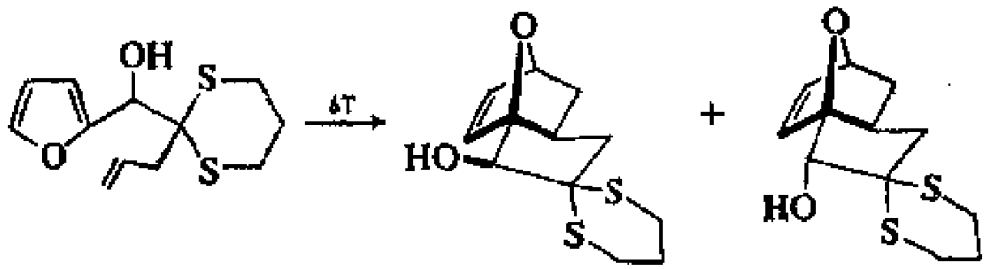
结合和疏水结合都用上了，为生物体系常见的多识别位点提供了一个模型。

由于组成环糊精的葡萄糖具有手性，环糊精内的反应可以产生手性诱导。利用与吡哆胺相结合的β-环糊精可以选择地进行苯基丙酮酸转化为苯丙氨酸的反应，所得产物L-异构体的e.e%可达52%[53]。W. Saenger等[54]测定了底物被环糊精包容之后的宿主构象变化，这颇与酶相似，酶具有诱导契合的特性。

此外，关于环糊精的研究尚有涉及用作视紫红质模型[55]以及由β-环糊精一步催化制备维生素K_1和K_2类似物的研究[56]等。总之，环糊精提供的酶模型具有疏水结合、介质（或穴）效应以及形成特定构象等定位效应，因而具有酶的催化效果。

5.5.1 新的生物模型

1980年，Breslow进行了下述实验。将呋喃化合物在水溶液中89℃加热6小时，得到了20%收率的Diels-Alder加成反应的产物，其中差向异构体混合物 A/B 为1:2。但此反应在有等

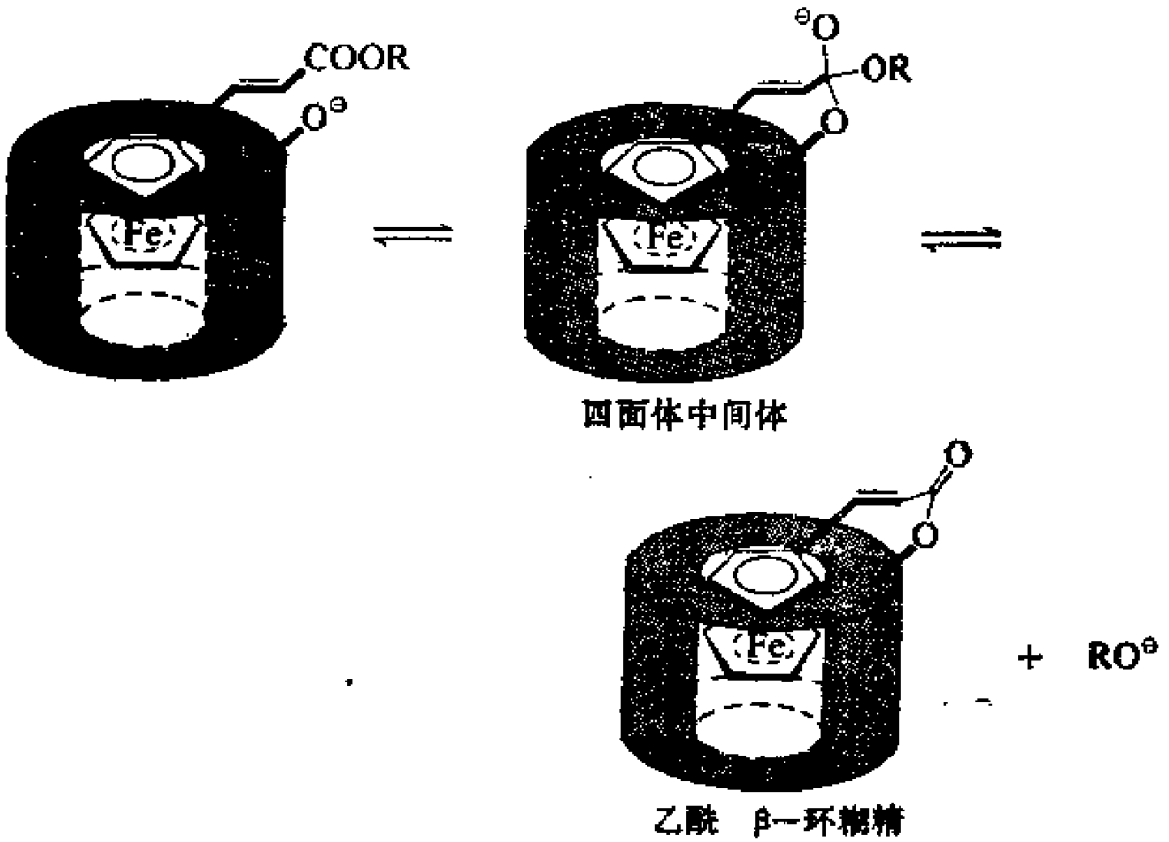


异构体-A　　异构体-B

当量β-环糊精存在时，收率可提高至 91%，差向异构体比例为 1:1.5[57]。显然，分子中的双烯和嗜双烯部分均与环糊精分子结合。α-环糊精未见催化效果。复合溶剂对于该反应的立体选择性有影响。

Breslow等制备了将环戊二烯铁丙烯酸酯配置于β-环糊精穴内的分子。该化合物可经分子内反应使丙烯酸硝基苯酯的水解加快3.3×10^6倍。而乙酯的水解在这种条件下却很慢。二者之间结合常数相差并不很大（苯酯为 133mol.L^{-1}，乙酸为24mol.L^{-1}）在碱性水解条件下，乙酯的反应速率只比苯酯慢 56 倍。同样对硝基苄酯与对硝基苯酯之间碱性水解速率相差也不大（31倍），在使用上述环糊精时也表现得与乙酯同样不活泼。

比较一下上述酯的离去基团，可以看出，当离去基pKa＜9时，有利于生成水解产物。这个pKa值比环糊精的羟基pKa要小3个单位。不过，这个结合了环戊二烯铁的环糊精的氧阴离子表现了较强的离去效能，这是由于分子内酰化的环糊精分子具有高能的s-cis构型，这种四面体中间体有将β-环糊精羟基氧负离子驱逐离去的较大倾向。因而，在简单酯的情况下，可恢复成原来



四面体中间体

乙酰 β—环糊精

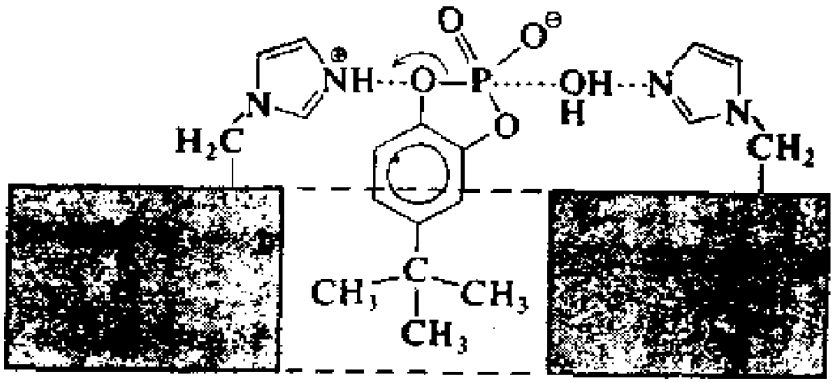
K 络合物/K未络合(速率加速)		离去基的pKa	
R=Et	＜2	R=Et	15.9
R=硝基苄基	＜2	R=硝基苄基	14.6
R=苯基	140	R=苯基	9.9
R=硝基苯基	3.3×10^5	R=硝基苯基	7.2

环糊精羟基的pKa=12

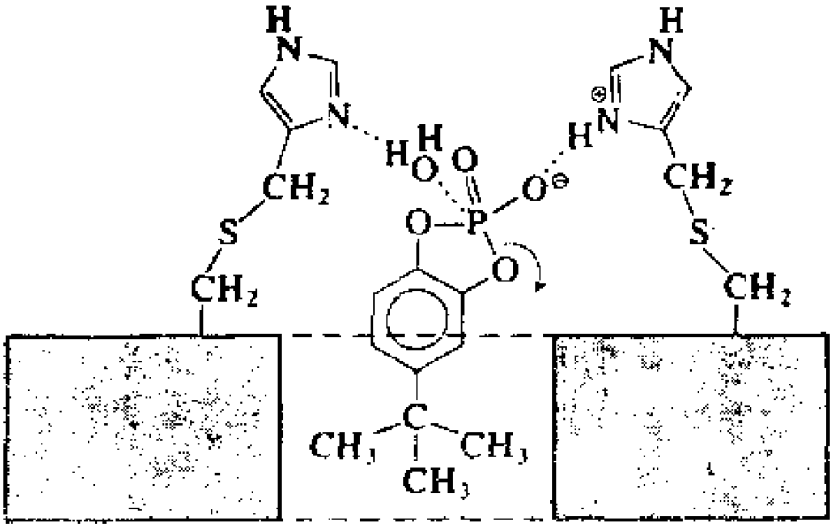
的复合物。但当酯的离去基活泼时，可优先离去-OR，得到水解产物。

前面，曾经提到对于核糖核酸酶 RNase 的模拟。β-环糊精6,6′-二咪唑在水解4-第三丁基·邻苯二酚的环磷酸酯时，可选择性地生成2-磷酸酯异构体（与第三丁基成间位），此情况可用下列图解表示。（见下页上）反应是以线性（in line）机理进行

Breslow设计了一种改进的双唑咪环糊精分子，但有一个附



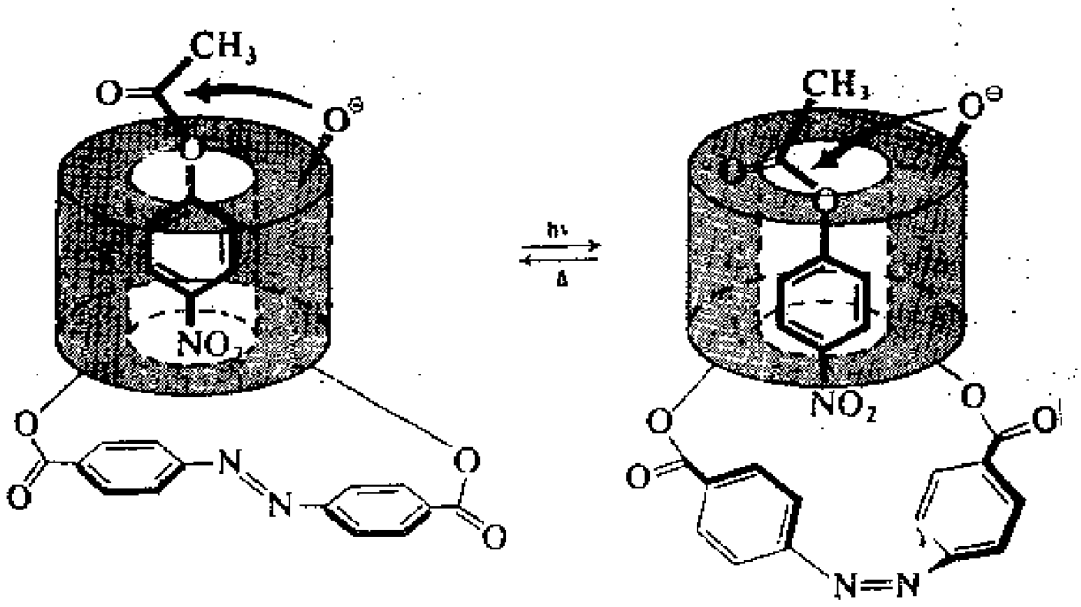
加的-GH_2-S-基团[58]。这个催化剂分子对环状磷酸酯进行水解时仍以线性机理进行，但结果得到较多的与第三丁基成对位的磷酸异构体。这个新分子由于几何配置不同，完全改变了催化裂解



的方向，表现出区域选择性。反应具有 2.5的H_2O/D_2O 同位素效应，说明是由水分子提供了广义的碱进攻试剂。不过它的催化活性较前一个模拟物小，前一个化合物反应速率增加17倍，本化合物只增加 8 倍。

在制备带盖的环糊精时，曾经制备了一种带有偶氮苯基的光敏环糊精。它对于对硝基苯酚酯的水解作用因光照而加速。当形成trans-异构体时，因孔穴太浅难以形成稳定复合物，尽管此时催化常数Kc较大（trans $1.6S^{-1}$，cis $0.7S^{-1}$），但cis型的米氏

常数Km较为有利（cis，0.2×10^{-1}mol.L^{-1}，trans 2.3×10^{-2} mol.L^{-1}），结果cis-异构体的Kc/Km值要大5倍。因此cis-异构体具有较高的催化力。

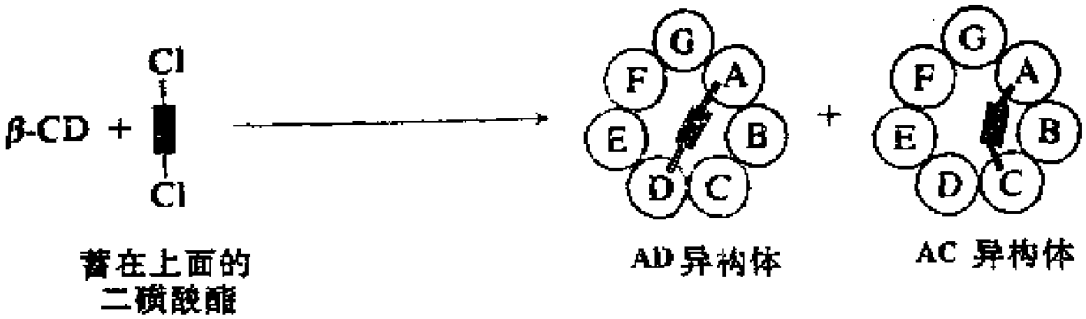


trans-异构体（浅空穴）　　Cis-异构体（深空穴）

β-环糊精分子具有不对称性。带有双功能基的盖，可因不同结合部位形成位置异构体，这可用下图说明[59]（见下页）。

Tabushi[60]曾制备了一种双功能基的β-环糊精，用作氨基酸的人工受体。

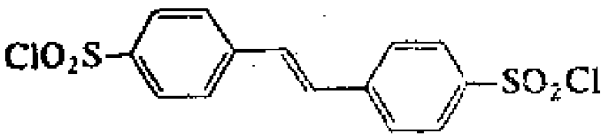
此外，还曾经把偶氮冠醚连接于β-环糊精分子上。这种带有冠醚盖的环糊精分子将两个识别部位集于一体，它对于对硝基酚的碱金属盐，尤其是钠盐比较未功能基化的环糊精结合常数增大70倍，钾盐和铯盐的结合常数增加较小。考虑到氮杂冠醚对于钠离子结合力比钾离子要小10倍，这里必然具有其它空间的张力因素存在。这种空间因素将影响阴阳离子与阳离子的结合，显然，钠盐情况是这两种因素平衡的结果。这也是对于酶的远离多肽骨架的功能基强烈结合底物的一种模拟方式。



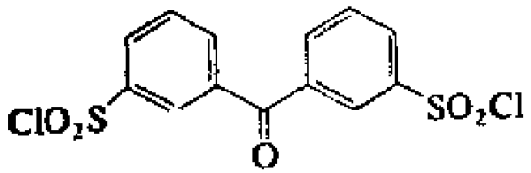
蓄在上面的二磺酸酯

AD异构体

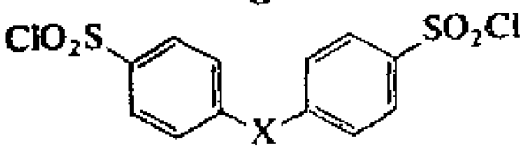
AC 异构体



几乎全部的　　极少

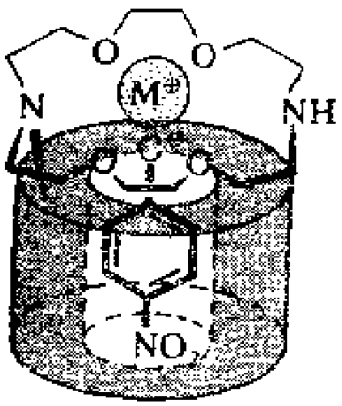


极少　　几乎全部的



X = O, CH_2

无选择性　　无选择性



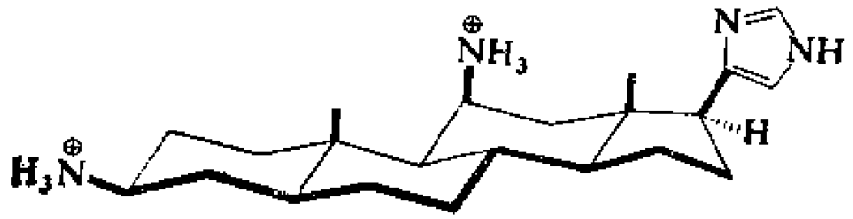
M=K^+, Na^+, Li^+

5.6 酶体模板

带有长脂肪烃链的催化基团，由于可和底物疏水结合，因此可以提高对于酯的水解速度。但当其形成胶束时，催化速度无明显增加。这类化合物难溶于水，因此有形成胶束的倾向，常常只能在较低浓度下工作。加之，脂肪链有多变性，不会形成强疏水

区域，因此需要形成一种固定骨架。

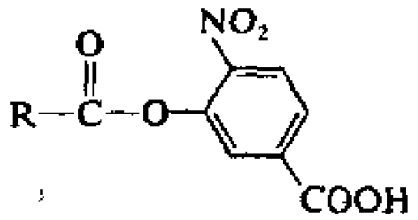
为了克服上述困难，J. P Guthrie 提出应用平面的甾体骨架[61]。他合成了雄甾烷-3β-11β-二氨基-17β(4)咪唑。这个分子中两个铵盐离子使其水溶解度很大，实验条件下不会形成胶束。



与三维体系的环糊精相比，这个甾体分子具有二维疏水平面，因此它是一个评价有明确结构的几何形状的疏水作用和电性效应的有效模型。其17位β咪唑基是酯水解的催化基团。为了说明疏水作用，曾经试验了一系列芳环羧酸酯。它们的疏水程度增大时，例如当 n = 2 或 3 时，相对的水解速率是 n = 1 时的 2 倍。而且发现，分子中疏水基增大，催化水解速率也随之增大，然而，如果只采用亲核试剂咪唑时，上述酯只具有相同的水解速率。另外，有关空间相对关系的研究指出，为了使甾体分子的α-面有足够的疏水接触，芳环和酯间必须具有 2 个$-CH_2-$基团。同时也可得到结论：咪唑对于酯的催化水解可因为底物和催化剂间的疏水作用而加速。

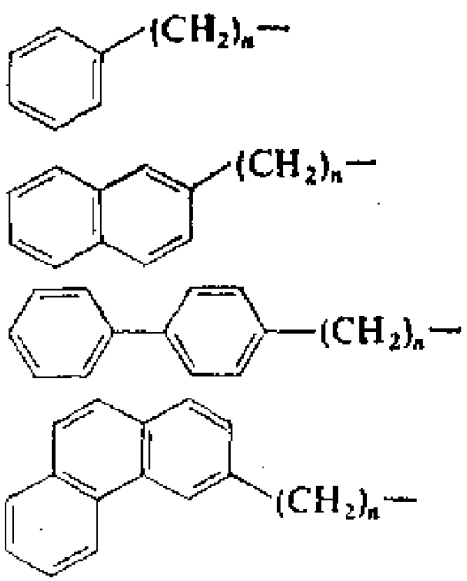
进一步的观察表明，这一催化反应表现为二级反应速率。因此，甾体和底物是1:1的化学计量关系。反应过程中形成的四面体中间状态也体现出底物和甾体环间的疏水结合。该体系的优点是底物和催化剂都只有较小的可变性。

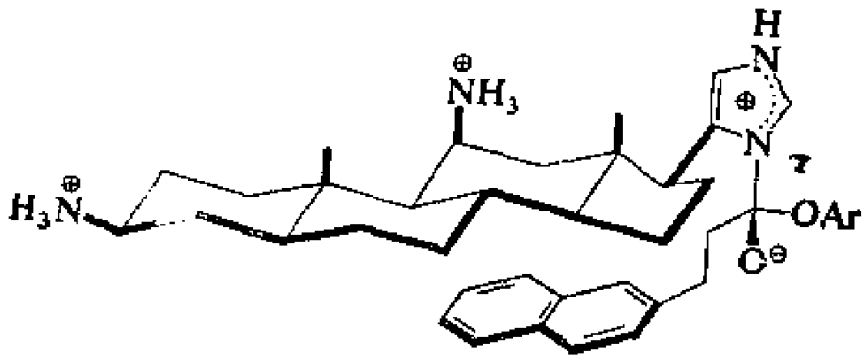
另外一个例子是用甾体催化剂进行了碱催化下的β-乙酰氧酮的β-消除反应的研究。这一反应的速控步骤是碱催化的酮烯醇化。当Ar基为苯、萘和菲基时，由于疏水作用而导致的速率增加分别为9.0、27和110。由于甾体与咪唑结合之后，其咪唑的pKa值变化并不大（咪唑 pKa 是7.1，甾体—咪唑的 pKa 值是



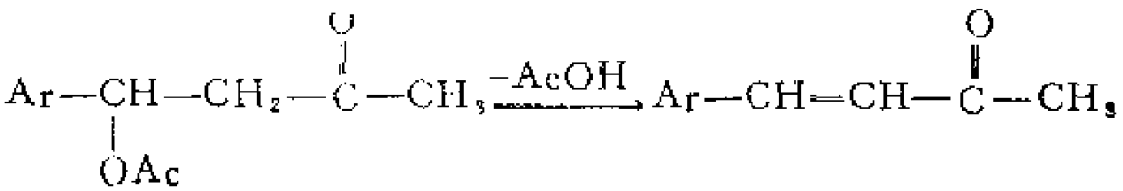
R

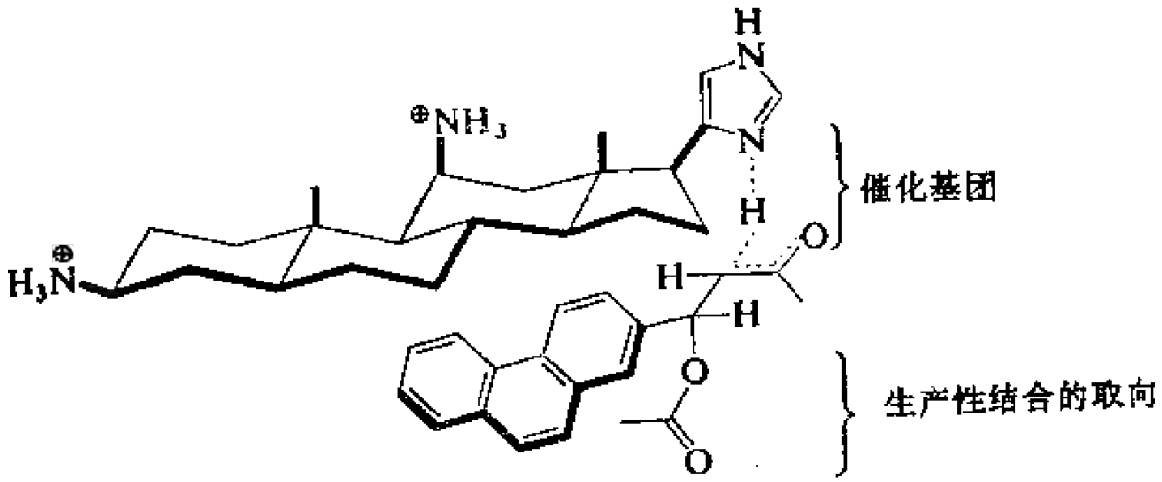
CH_3



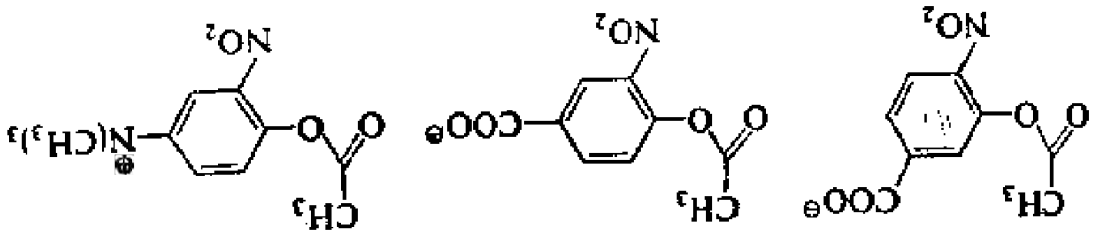


7.2)，因此反应速率的增加不是由于碱性增强。显然疏水结合是速率增加的原因，它使留体环和底物之间紧密结合。



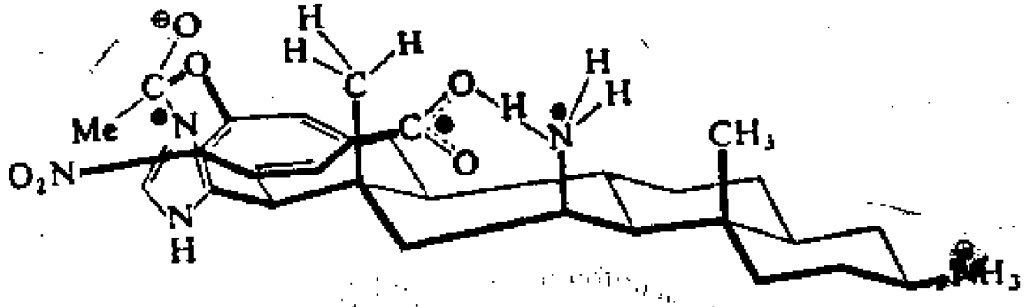


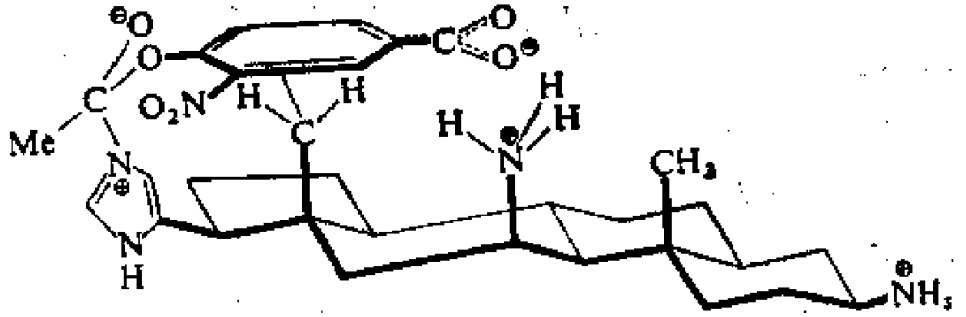
某些实验曾对带电荷的下列乙酰基底物的水解进行了研究。实验结果表明，笛体-咪唑的铵盐使带正电荷的底物的水解速率下降；但可增加带负电荷的底物的水解速率，而且负电荷处在间位时要比处于邻位时有利。



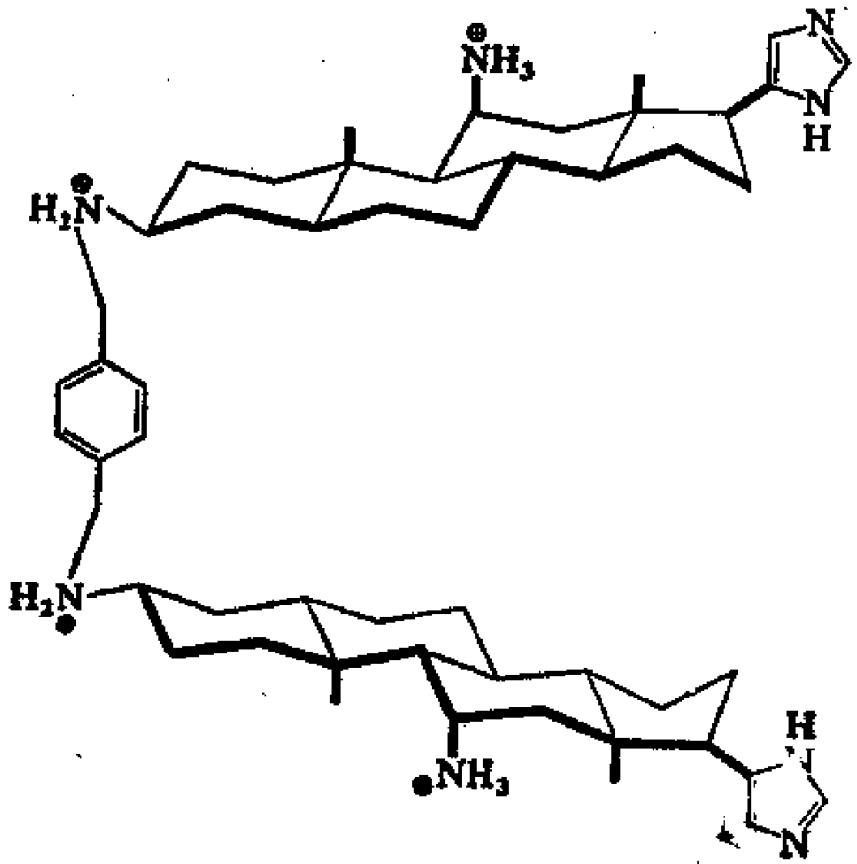
这是一种远离反应中心的电荷部位配置影响催化效能的范例。下面的结构表明，在形成的四面体中间体中，底物分子中的m-COO^-和催化分子内的-$\overset{+}{N}H_4$可紧密接触。而这个11-$\overset{+}{N}H_3$如果要和P-COO^-作用时，则受到两个分子间溶剂化的影响，溶剂分子阻挡了分子中荷电基团的静电引力。

上述例子表明笛体系统是一个适用的酶模型，因为它使催化剂和底物之间有良好结合，而且对底物还有一定选择性。笛体-咪唑体系中除需要较强的结合力外，还应该朝着能迫使底物只以一种结合方式的方向发展。为此，Guthrie 等合成了一种带有芳香二胺体系的笛体-咪唑二聚体。这种结构具有三维空间立体结





构，底物可以被捕捉在二聚催化剂的“叉钳”处，因而疏水作用来自于物底物的两面。实验数据指出，双(11)-酮衍生物比



咪唑的催化力要大3000倍。如果水溶性的双(11)-铵离子衍生物作用于芳香丙酸酯时，水解速率要比咪唑大5500倍。

5.7 远程功能基化反应

自然界具有的能将底物选择性地功能基化的能力，最近已引起化学家的重视[62]。例如脱氢酶可以将硬脂酸的烷烃链中某一特定部位脱氢氧化成双键，生成顺式油酸。基于对酶的这种功能的认识，Breslow等首先提出了应用“远程功能化原理”选择性地氧化烷链烃[63]。他们采用二苯甲酮的羧酸酯，利用紫外光活化二苯甲酮的三线态进攻脂肪醇链烃中不活泼的$-CH_2-$。反应中生成的自由基选择地进攻链烃之后，经臭氧氧化再生二苯甲酮，烃被氧化收率可达66%。

表5-2 酯的烷基侧链氧化的情况（以百分比计算）

氧化位置	酯中侧链碳原子数			
	C-14	C-16	C-18	C-20
C-8	—	—	—	—
C-9	—	—	—	—
C-10	—	8	8	5
C-11	11	10—12	17	15
C-12	49	8—13	21	20
C-13	22	3—10	18	19
C-14	—	56—66	12	19
C-15	—	7—10	5	13
C-16	—	—	13	8
C-17	—	—	6	—

a. 破折号表示无产物

二苯酮-4-羧酸脂肪醇酯插入到由十二烷基磺酸钠或卵磷脂形成的胶束中可以用作膜模型的光化学探针[64]。

利用这种设想将二苯酮生色团连接到甾体分子的3α位上，

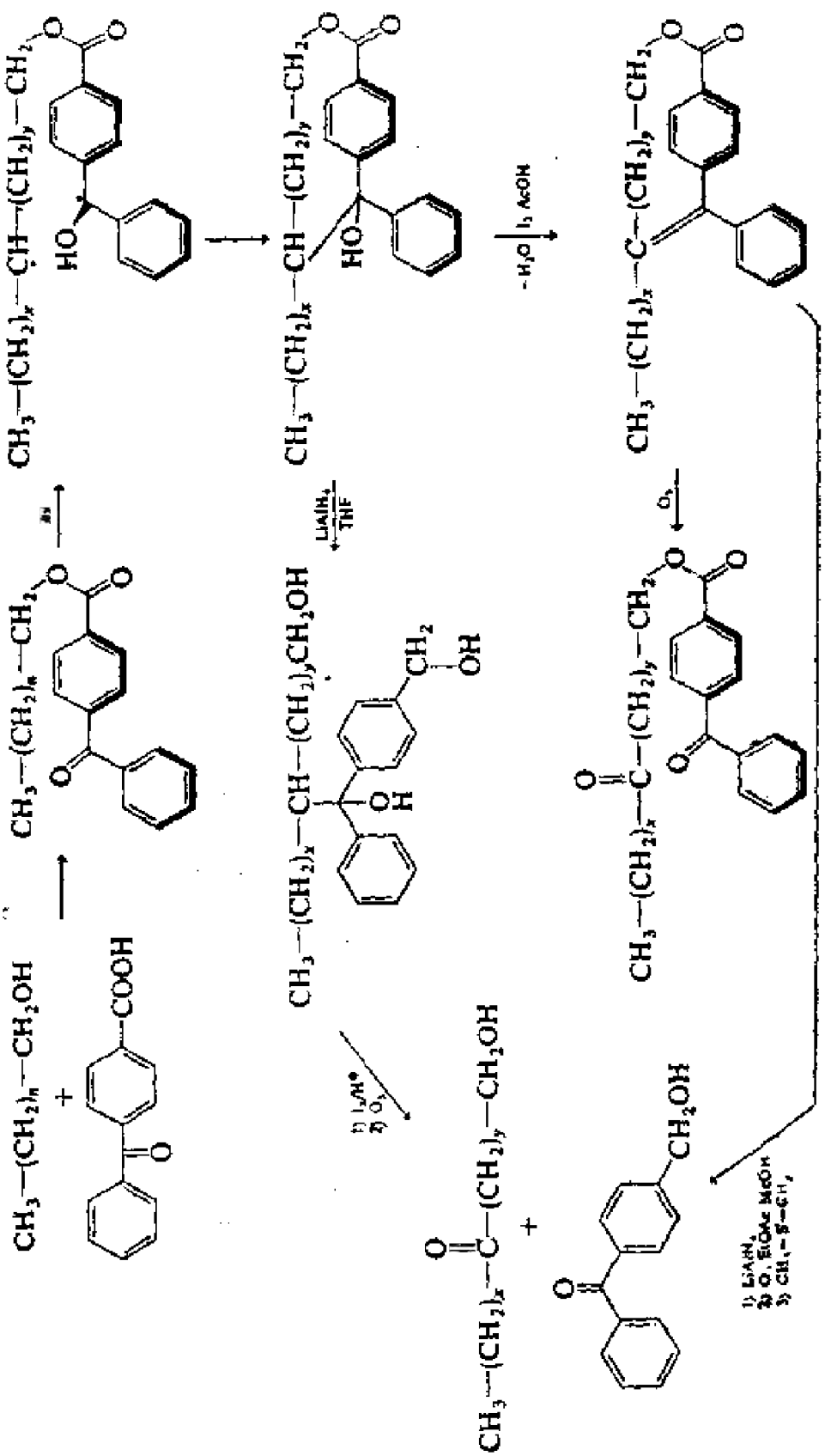
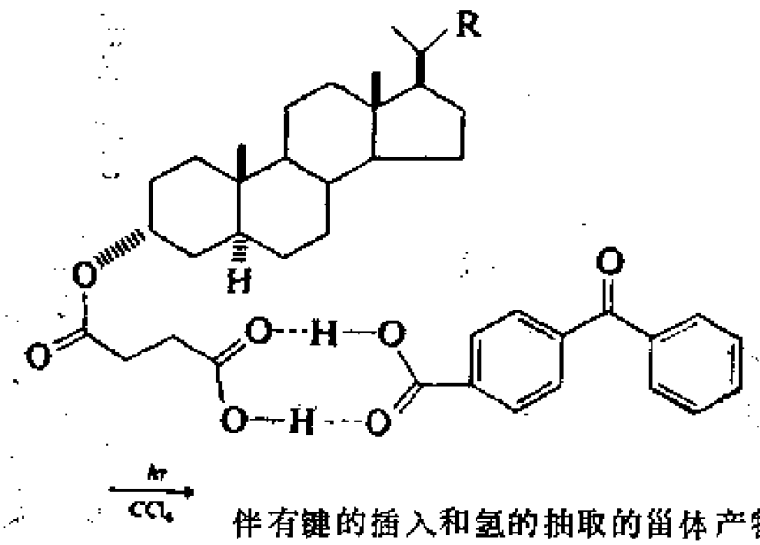


图5-25　Breslow的远程功能化反应的图解

可以生成一系列选择性功能基化的衍生物（见图5-26）。而且，实验还表明，底物与催化剂间即使在共价键不存在的情况也能达到远程引入功能基的目的。下面的例子说明，籍助于两者之间的静电作用力可以把它们拉得很近，此时也能发生插入和脱氢反应。



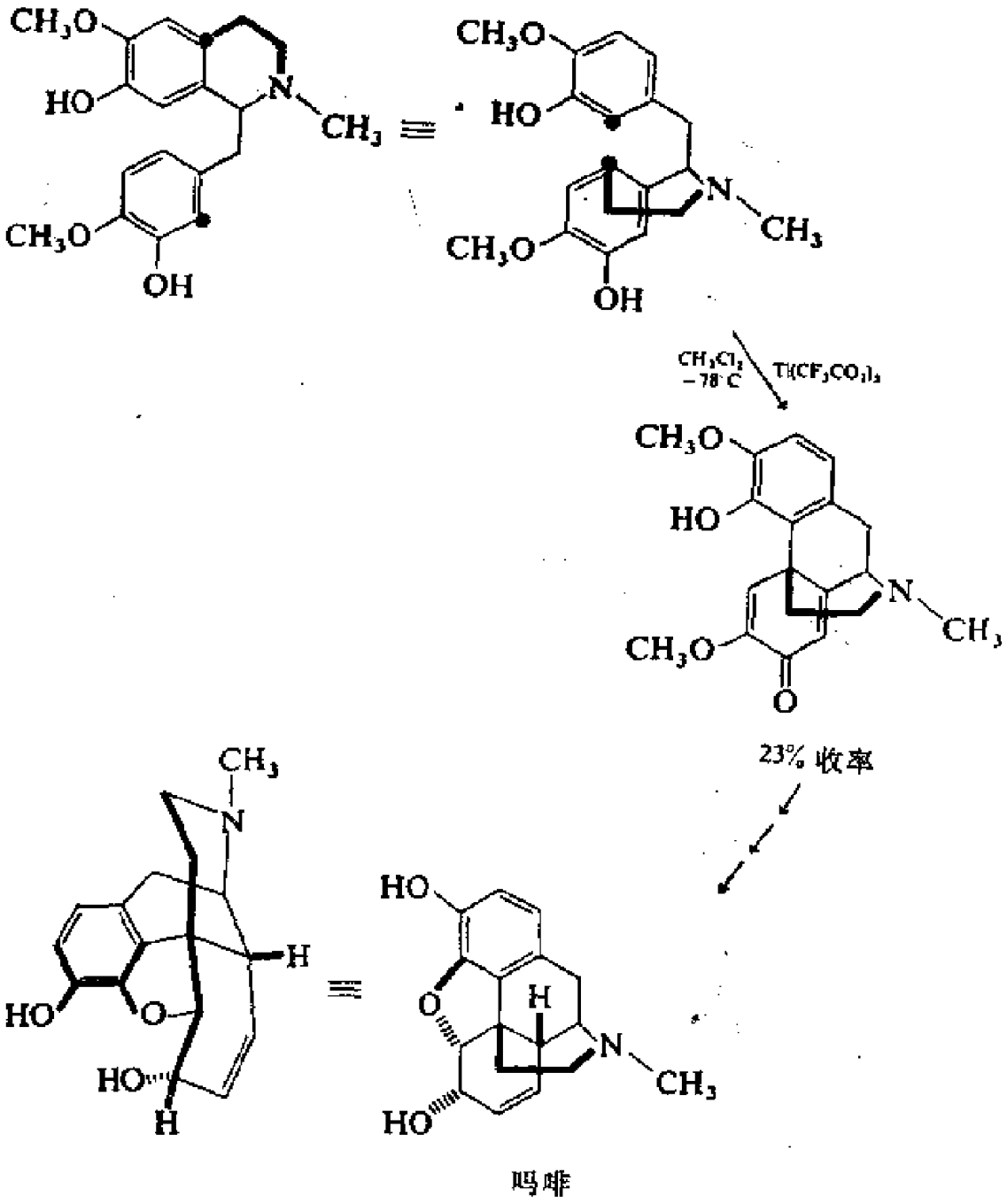
伴有键的插入和氢的抽取的甾体产物

远程功能基化的另外例证是利用对-二氯碘代苯甲酸酯导致甾体部分分子内的卤化和消除反应[65]。这种方法可被用于可的松的合成方面[66]。甾体模板不同，进攻的部位也常不尽相同，这里和酶的催化性能的专一化有相似之处。

5.7.1 其它有关的仿生合成

自然界生物碱的生物合成中常涉及由酶进行的单电子转移，导致酚的氧化偶联反应。这种苯酚的氧化偶联不只限于生物碱，在单宁、木素以及植物色素等生物合成中也存在。最近发展了一种化学模型，利用Tl^{+++}诱导苯酚氧化偶联以合成吗啡[67]。反应机制涉及苯酚自由基形成和二聚。

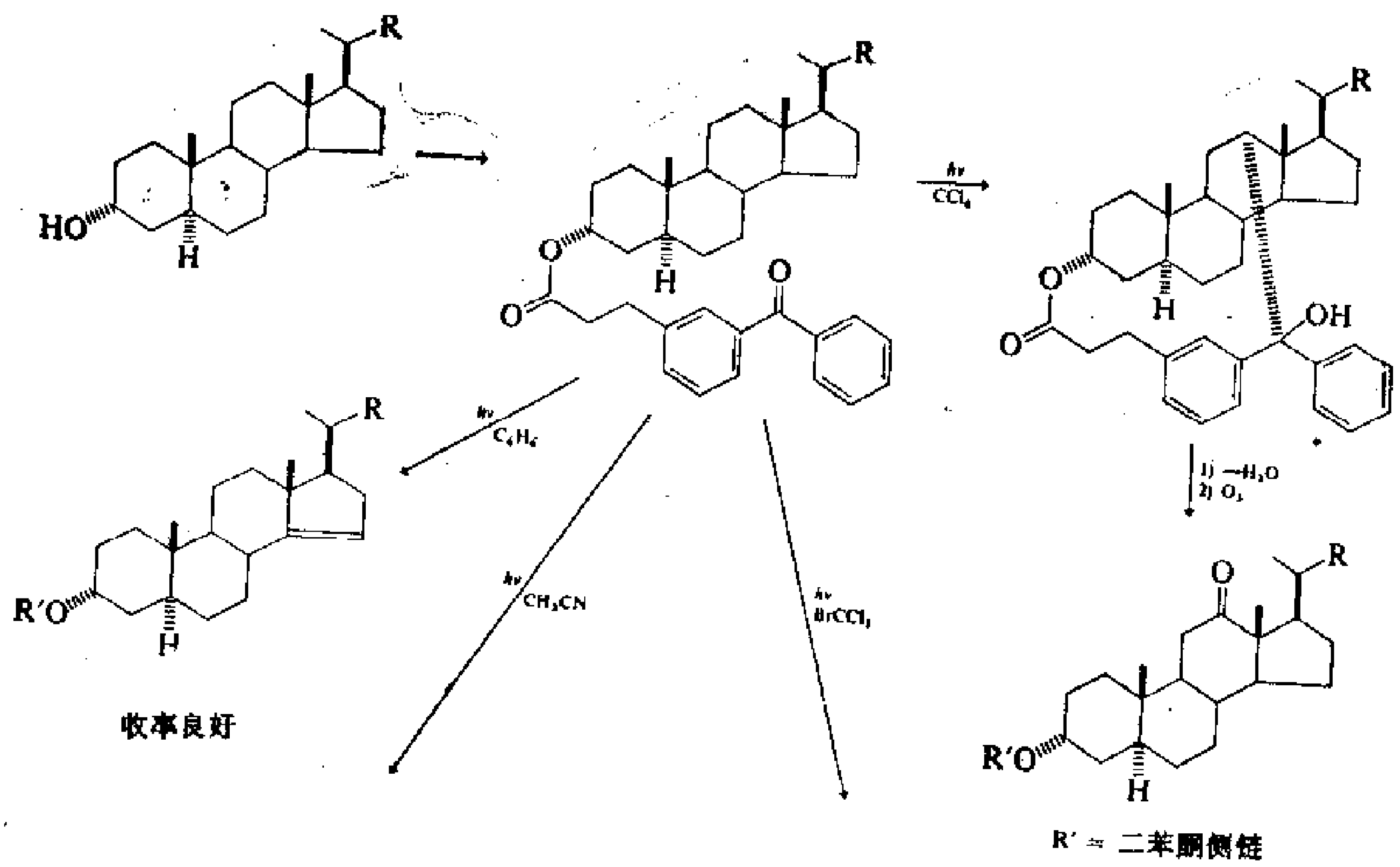
另外一个具有实际应用价值的生物氧化例子是前列腺素生物合成中发现的[68]。自然界中，由含有3—4双键的脂肪酸前体的选择性氧化可得到前列腺素。含有多个双键的不饱和脂肪酸，在氧存在下，可经环氧酶氧化。其中涉及两个连续的自由基反



吗啡

应，并生成双环内型过氧物中间体，其经分解可得各种前列腺分子，如PGE_2、$PGF_{2\alpha}$、TXA_2和PGI_2等（如图5-27所示）：

由于过氧自由基环化对于生物氧化的重要性，曾使用简单的有机模型阐述此机理，以帮助我们理解这些自由基反应活性的一


R
HO
H
hν
CCl_4
O
OH
1) $-H_2O$
2) O_3
C_6H_6
CH_3CN
$BrCCl_3$
R′O
收率良好
R′ = 二苯酮侧链

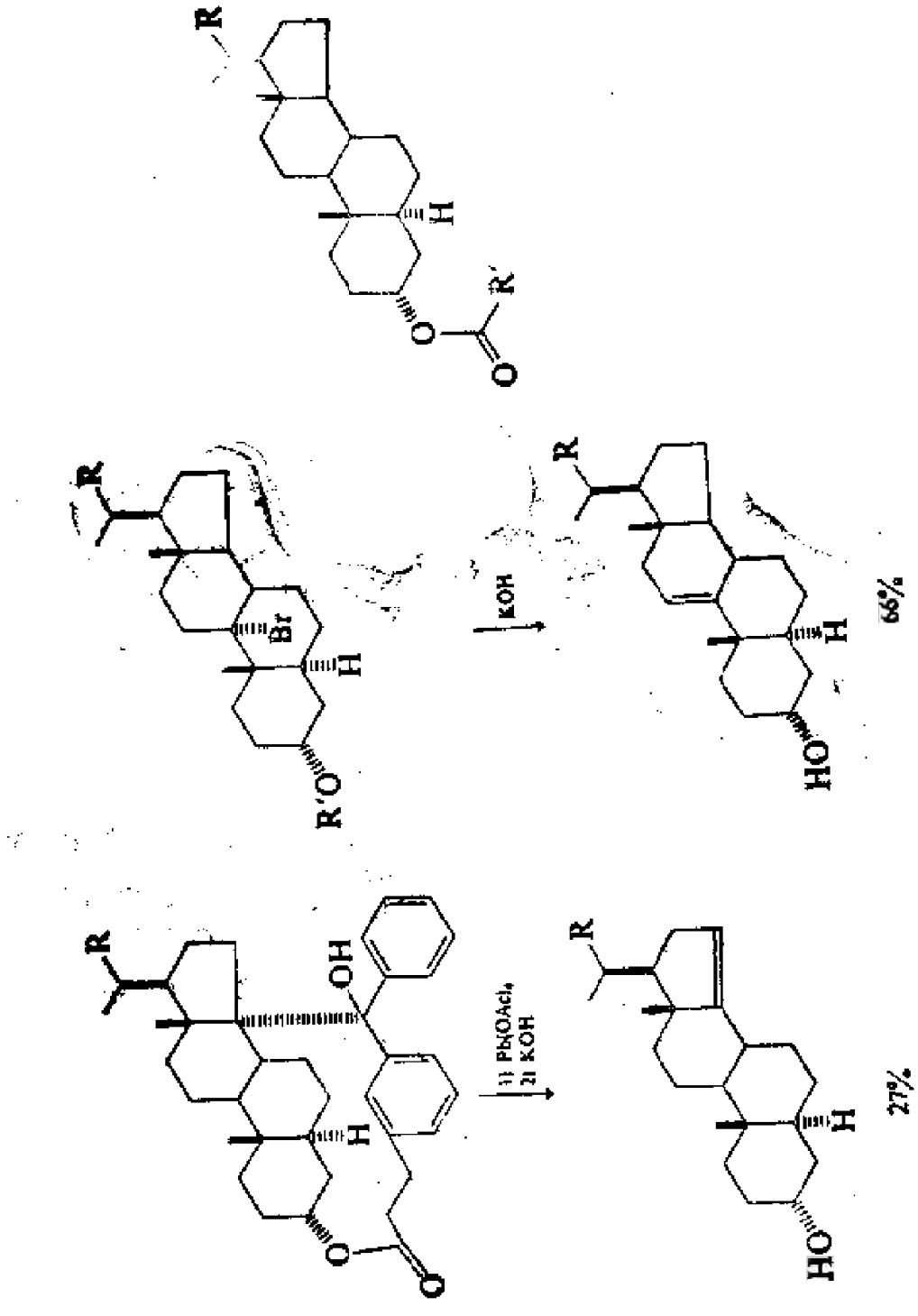


图5-26　甾体分子远程功能化

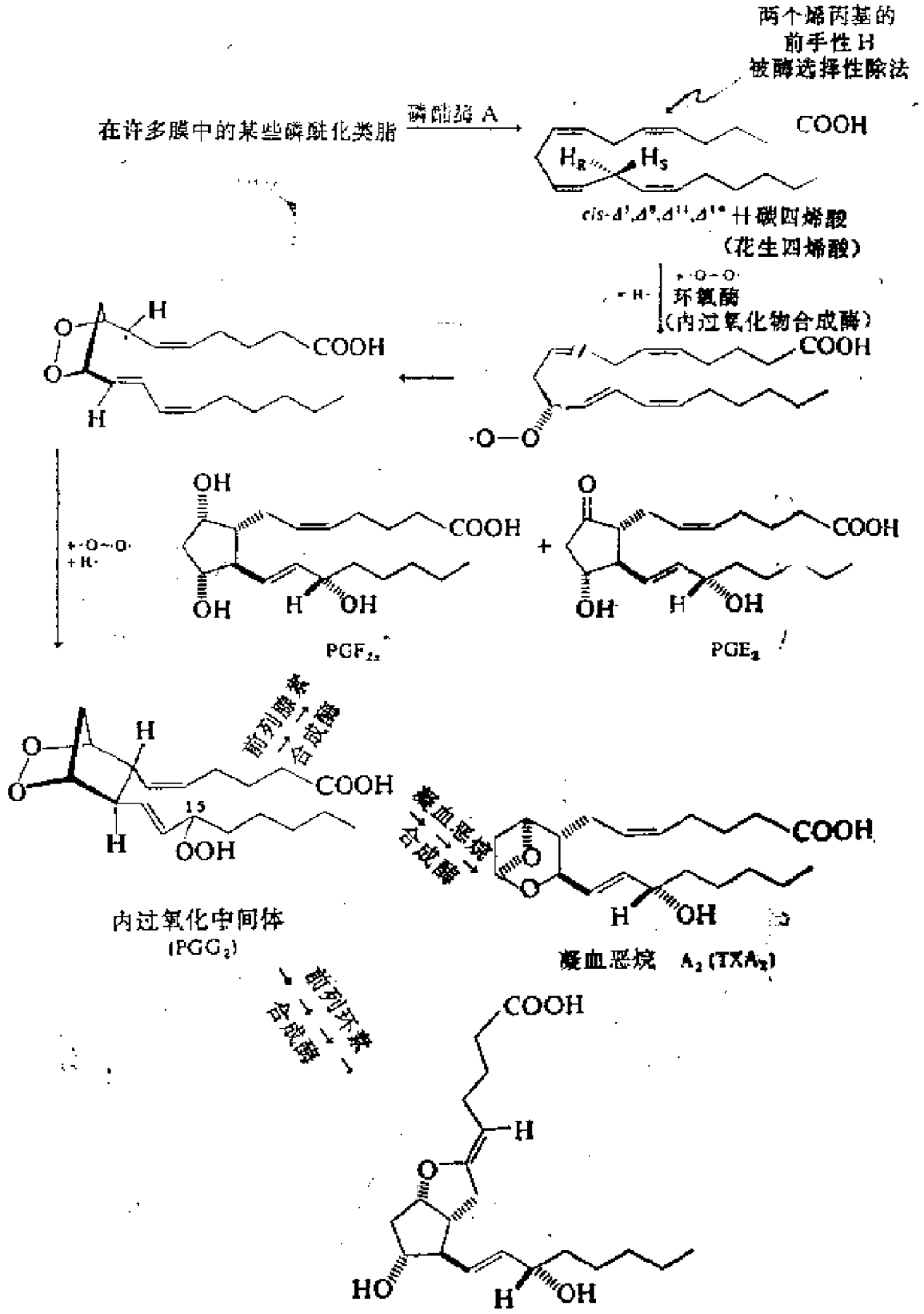
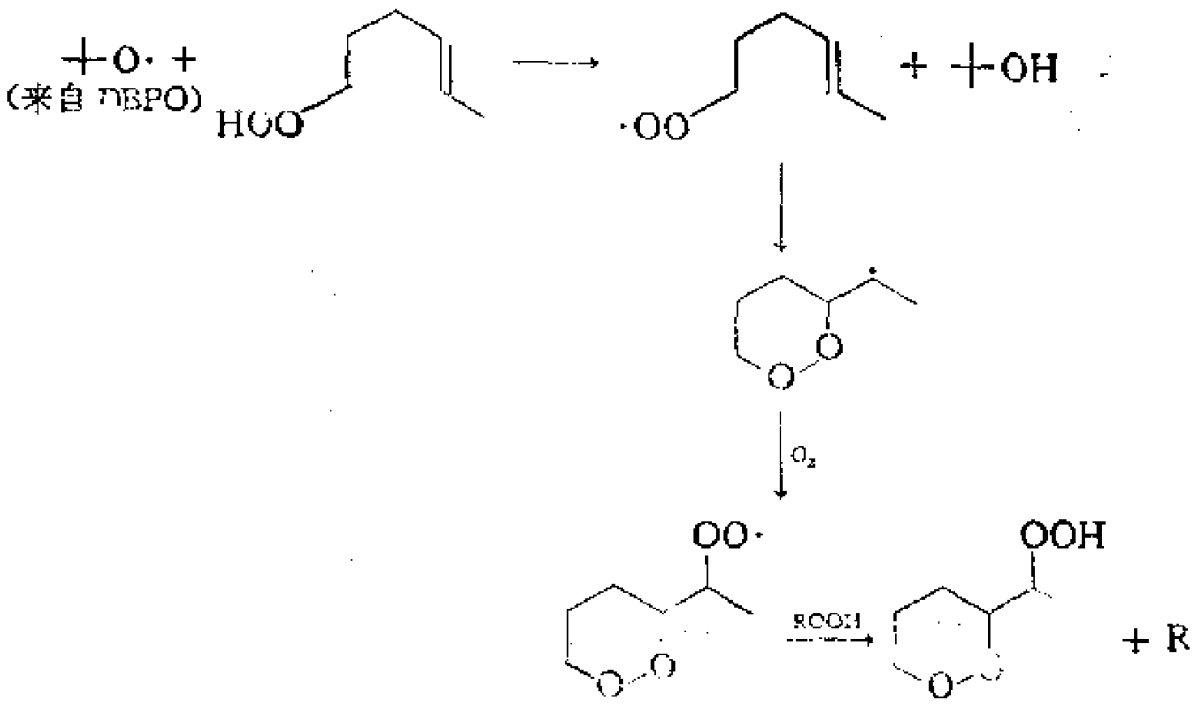


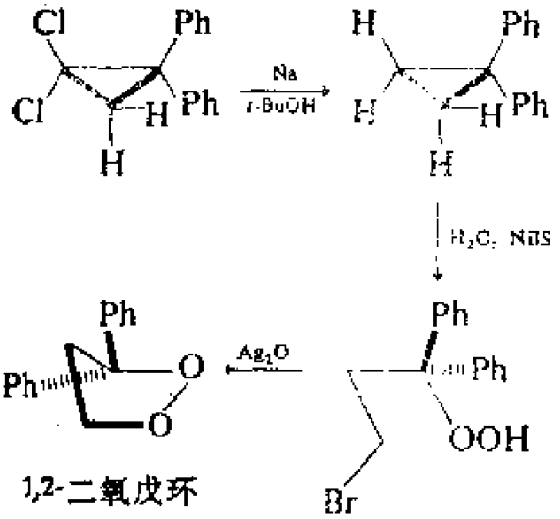
图5-27　前列腺素及其衍生物的生物合成

般原则。Portev 等报道了一种生成过氧自由基的方法[60]。此方法的关键是羟基过氧化物（ROOH）中的氢容易被叔丁氧自由基除去。二-叔丁基过氧草酸酯(DBPO) 可以产生过氧自由基，从而导致两个连续的自由基环化反应。

这个模型系统被用作研究前列腺素形成中的自由基环化反应。

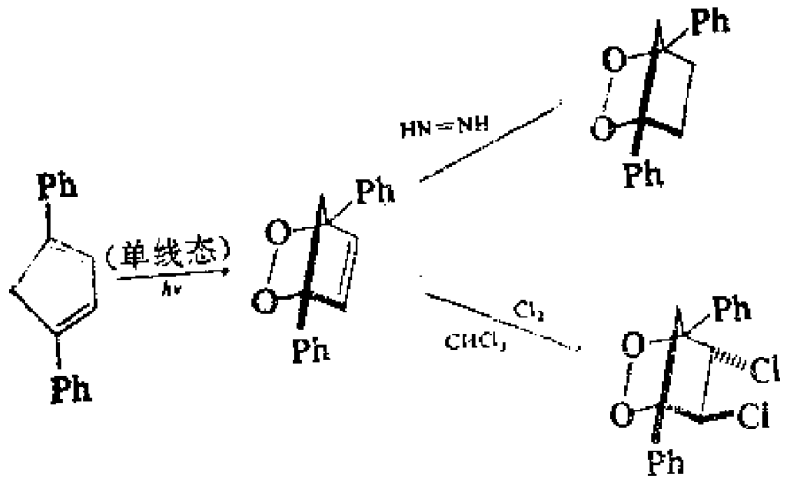
另外一种有关前列腺素内型过氧化物的模型化合物是通过环丙烷的过氧化氢溴化反应，然后，环化生成的γ-过氧化氢溴化物得到的1,2-二氧戊环。这个结果说明，环丙烷可作为一种有效的合成子用来制备内型过氧化物。





1,2-二氧戊环

Salomon等合成了一些2,3-二氧双环[2,2,1]-庚烷的衍生物。作为前列腺素内型过氧化物的一种张力双环过氧化物结构，它可由2,3-二氧双环[2,2,1]己-5-烯与二亚胺选择性还原或氯化反应来制备。



5.8 仿生多烯环化

仿生合成就是根据已知或假定的生物转化，设计实验室内能

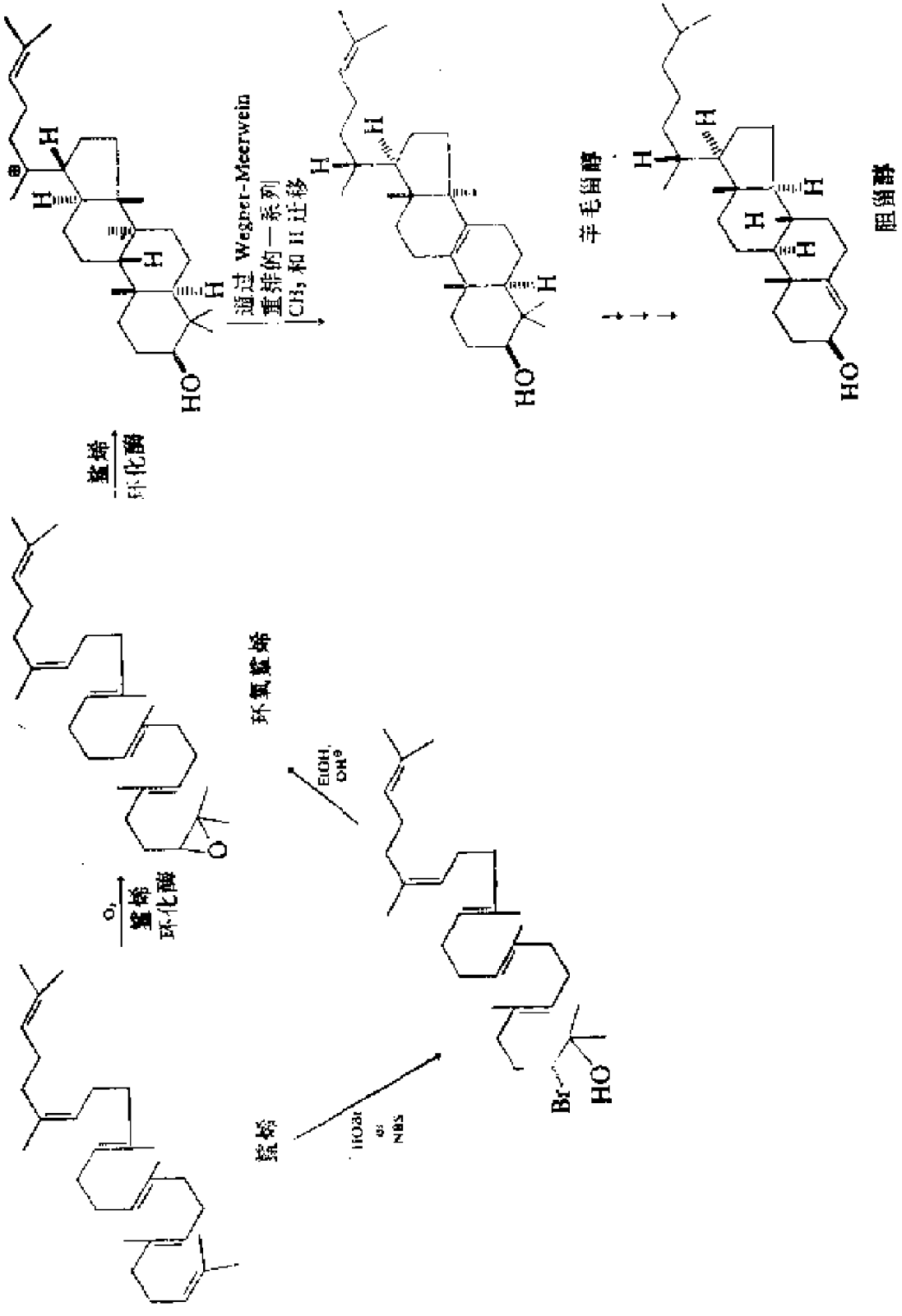
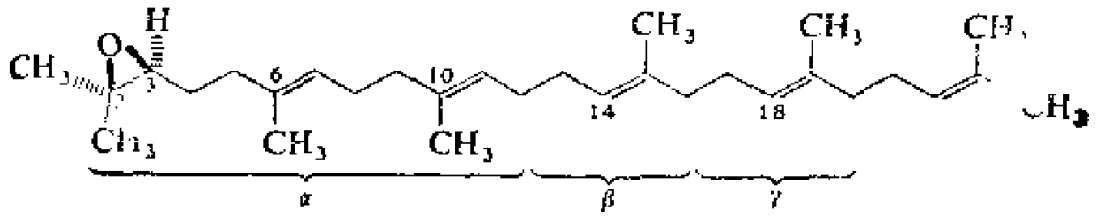


图5-28　2,3环氧鲨烯的化学合成及其转化为胆甾烷醇

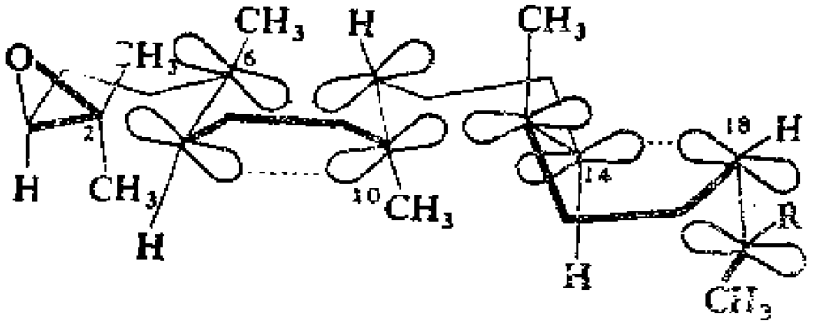
完成的反应，以合成各种天然物或其前体。Van Tamelen[70]及Johnson[71]在此领域作了许多工作。

五十年代Stork和Eschenmoser建议通过同步的氧化环合将鲨烯转化成羊毛甾醇。这个转化是在酸催化下通过正碳离子使所有四个环全部关环。第一步是选择性地环氧化$\Delta^{2,3}$-双键，形成2,3-环氧鲨烯。关于环氧鲨烯也曾经由相应的溴醇制备但也可在鼠肝匀浆的体系内合成。看来，2,3-环氧鲨烯是在酶作用下生成胆固醇及其它甾体激素的前体。

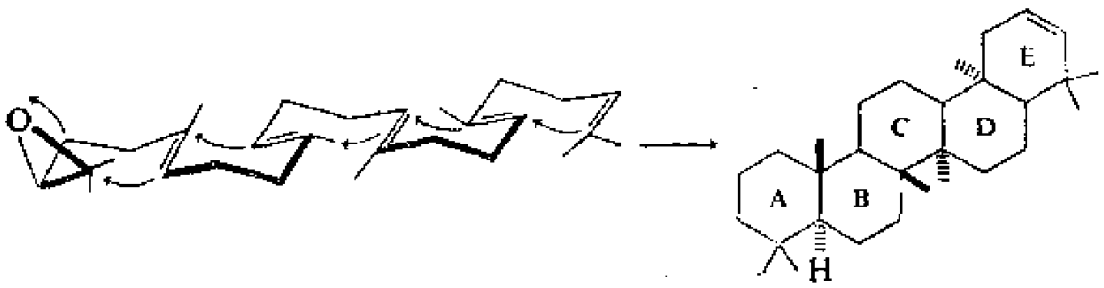
如果考查一下环氧鲨烯骨架，可发现存在着三个不同部位的π-电子体系，可将其标示α、β和γ区。



在进行环化反应时，α区域对环化酶是主要部位。其次则是β-区域，要使此区域中的Δ^{11}位双键和将与其成键的碳正离子间有特殊定位。反应是连续进行，直到四个环全部形成。鲨烯氧化物环氧酶的作用是维持碳骨架处于合适取向，以保证在生成甾体骨架中的σ键时，成键轨道的最大重叠。一种被称之为Stok-Eschenmoser的假说可以表达如下：



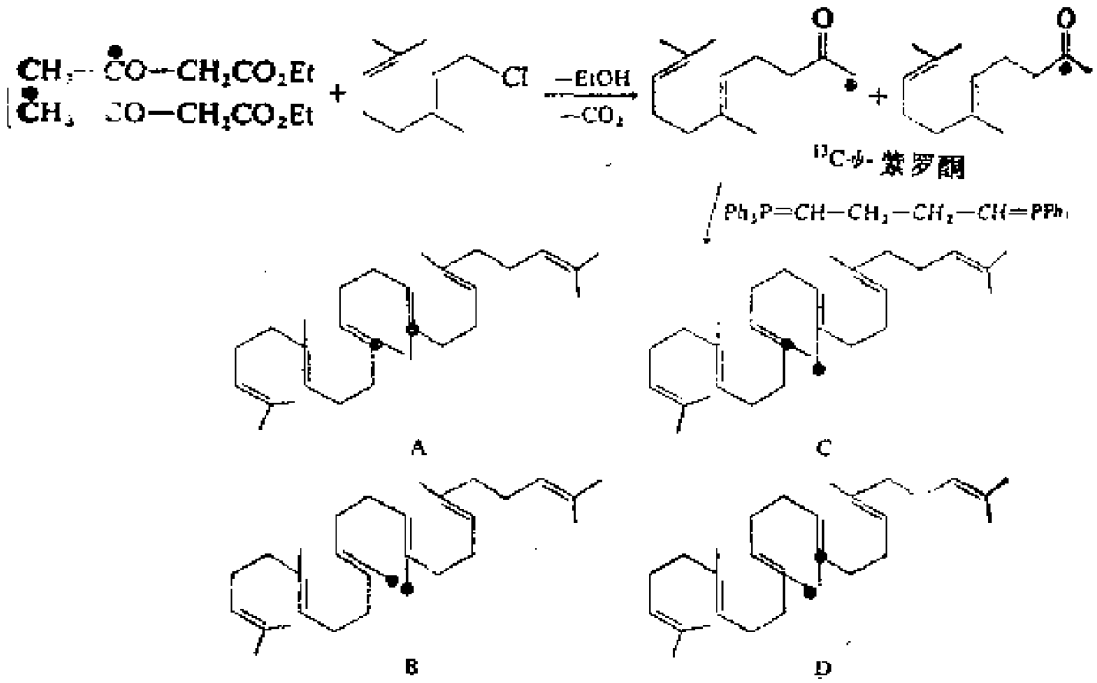
这种骨架的三维图像表明了三个主要的电子轨道重叠。首先，是环氧-Δ^6双键体系，双键（C_7位）在C_3上进行S_N2反应；



其次是$\triangle^{5}$—$\triangle^{10}$的重叠，它采取船式构象最有利；以及最后是，$\triangle^{10}$—$\triangle^{14}$，$\triangle^{14}$—$\triangle^{18}$之间的轨道重叠。角鲨烯在生物转化中生成的螺旋状过渡态有助于协同环化过程。当然，这个环化过程十分复杂。Corey 首先研究了鲨烯环化反应中的引发问题[72]。有趣的是，植物甾醇生物合成过程与动物体内所采取的上述椅式、船式、椅式环合方式不同，是采取了全椅式的折叠过程。

在上述反应中，除了选择性氧化之外，有关 Wagner-Meerwein 重排中氢和甲基的迁移也是一个值得研究的问题。

1958 年 Bloch[73]为解决上述困惑问题曾设计了一个富有想象力的实验。他以含^{14}C选择标记的4-紫罗兰酮为起始物，通过



Wittig 反应合成了四种不同标记的鲨烯。通过酶环化这些标记的鲨烯则分别得到相应的羊毛甾醇，如图5-29。

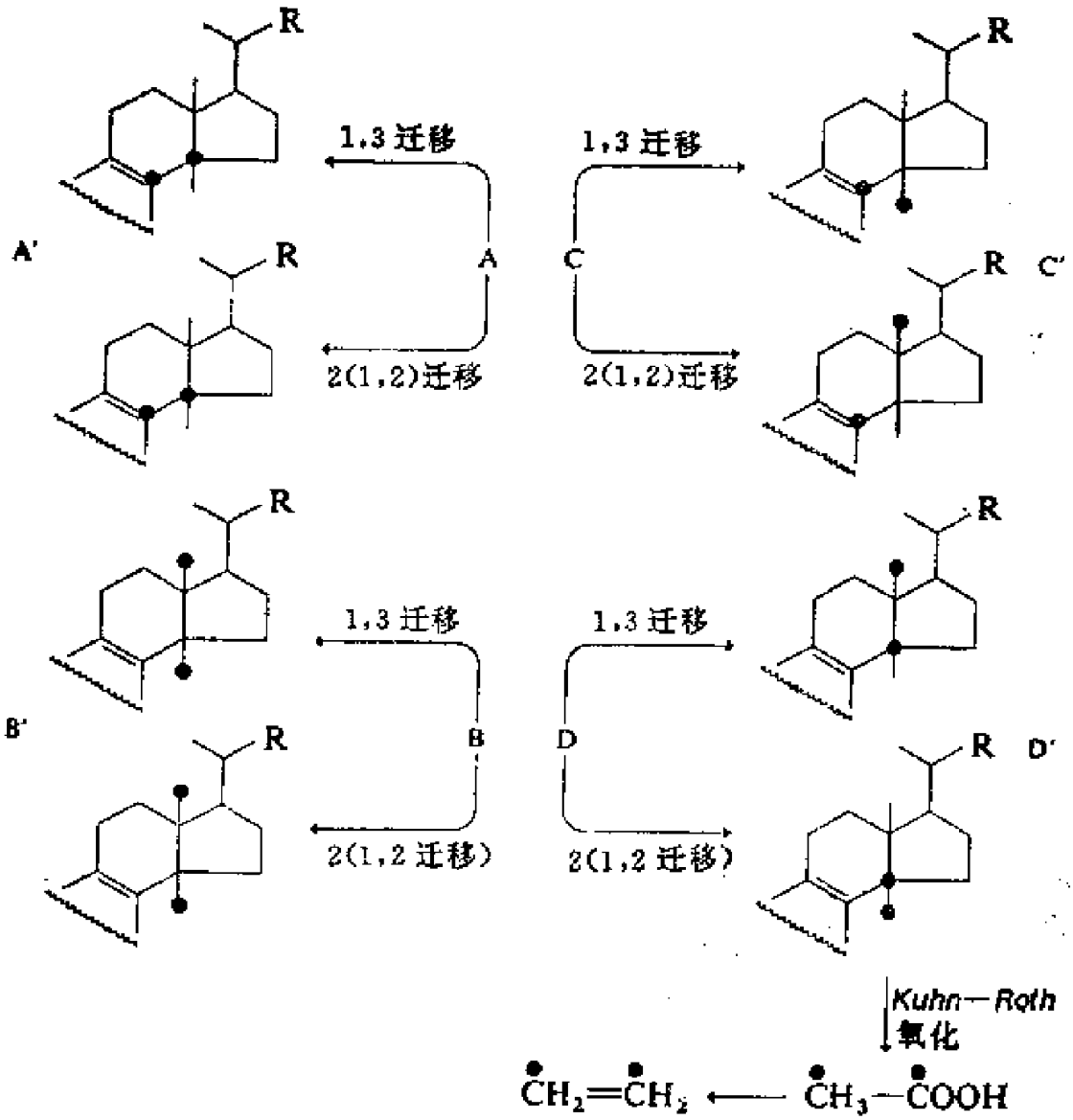


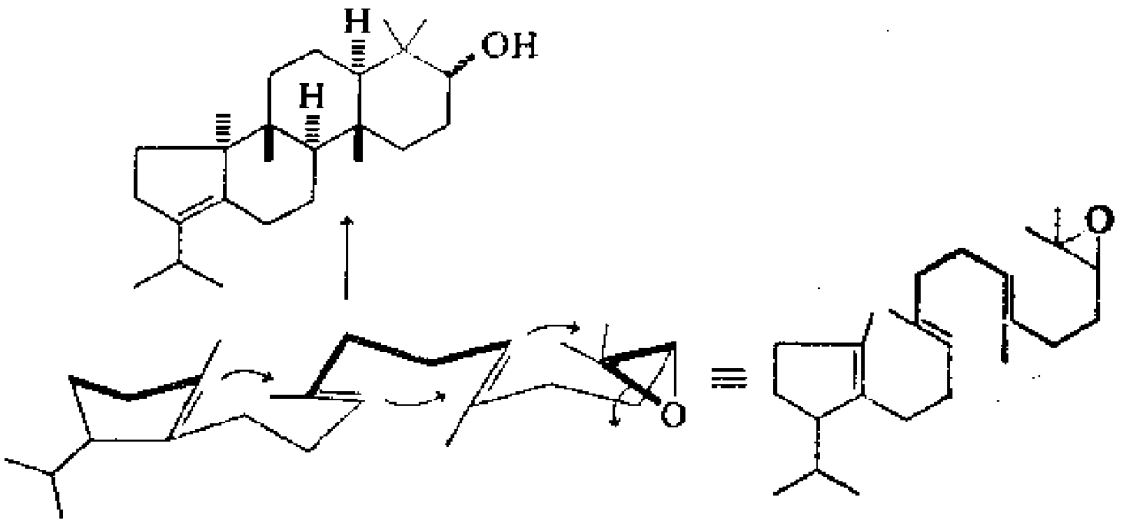
图5-29 Bloch有关在羊毛甾醇生物合成中1,2-甲基迁移的实验

用标记的鲨烯通过氧化降解生成乙酸盐直至乙烯，再用质谱进行分析。只有结构D给出两个碳原子均为标记的乙烯，这说明在这个过程中二个1,2-甲基迁移是实际存在。

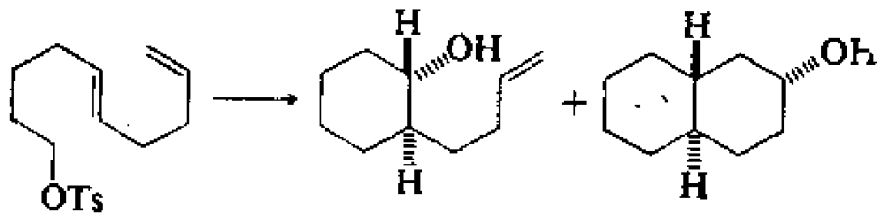
上述由鲨烯向羊毛甾醇酶转化机理的研究，使我们可以设想

实现实验室内全合成多环天然物的战略。

Van Tamelen 利用一个首先形成D环的前体进行上述环化反应研究。当这个前体的过氧化物用Lewis酸处理时，可得高收率的异大戟烯醇体系。环合过程中按全椅式机制，五个不对称碳原子一次生成。其中D环是以“隔离子”的作用，使环化过程中



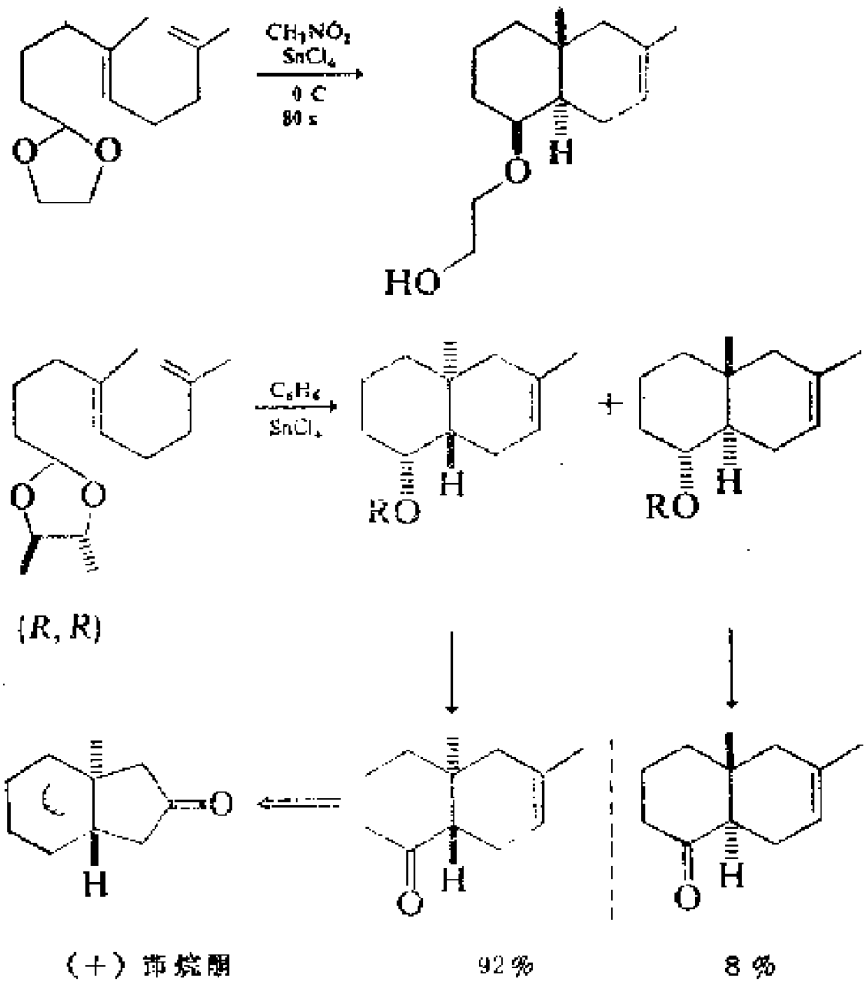
不致引起侧链卷入。此外，Johnson 等也进行了关于反式烯烃链的一步环合而生成立体特异性环的研究，所得到的环具有天然产物的全反式构型。



反-十氢化萘体系

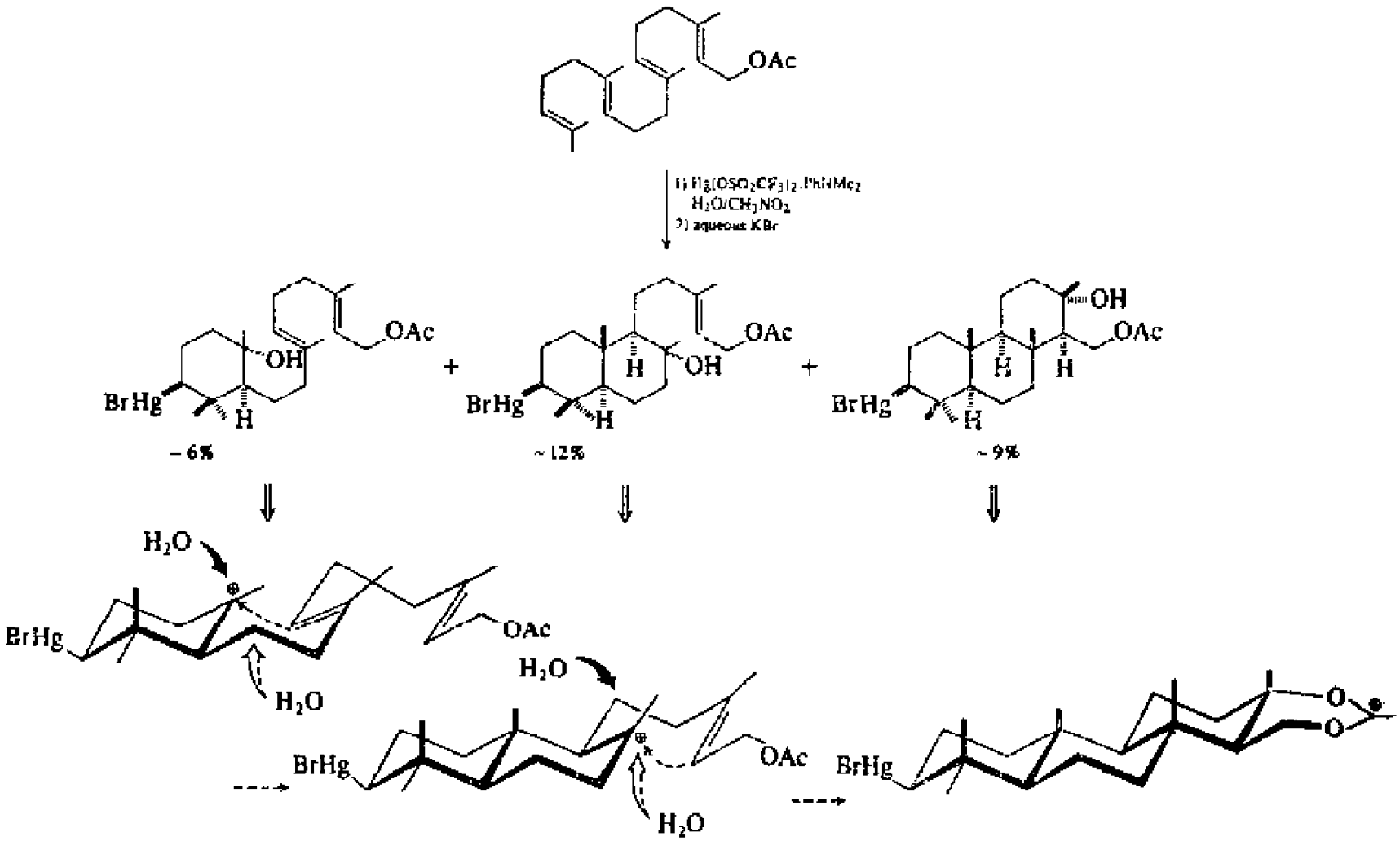
采用缩醛功能基作为环合反应引发剂，可以得到较高收率的反式双环物质。

如果缩醛是有光学活性的，则形成高度不对称的诱导，得到对映体的比例是 92:8。当环合反应扩展到四环系列时，得到D-高甾族差向异构体。收率30%，立体化学为全反式。在这个环合



过程中有七个不对称碳原子生成，但仅生成可能的64种立体异构体的两种，立体选择性很强。这种全反式构型产物的协同转化是仿生化学中杰出的贡献、也是与自然界生物转化中最为接近的非酶途径。

Nishizawa等希望通过实验进一步验证上述环氧角鲨烯环化机制是同步还是分步？分步机制将包含一系列刚性构象的正离子中间体。他们采用烯烃环化试剂三氟醋酸汞和 N，N′-二甲苯胺的络合物在硝基甲烷/水的溶液中；将（E，E，E）-牻牛儿基乙酸酯转化成单环、二环和三环化合物的叔醇混合物，它们是水捕捉中间生成的碳正离子后形成的。显然，在环化反应中，中间体碳正离子是存在的。在单环和双环化合物中，生成的醇处于平伏键，说明中间体正离子由α侧被水溶剂化，如果环化同步进行这种


OAc
1) Hg(OSO2CF3)2, PhNMe2
H2O/CH3NO2
2) aqueous KBr
OAc
OH
BrHg
H
~6%
OAc
H
OH
BrHg
H
~12%
OH
OAc
H
H
BrHg
H
~9%
H2O
BrHg
OAc
H2O
H2O
BrHg
OAc
H2O
BrHg
O
O

水合是不可能发生的。

此外，对于上述转化中为什么只生成六元环的问题[74]，以及通过负电荷互补稳定正电荷中心的问题[75]均进行了研究。

自然界在酶环化角鲨烯中可能利用它的三、四级结构中的特殊氨基酸稳定过渡态发展的中间体正碳离子。因此建造环化过程过渡态类似的分子，并且观察它们能否抑制酶将是一个令人向往的研究课题。

岳保珍

第6章　辅酶的化学

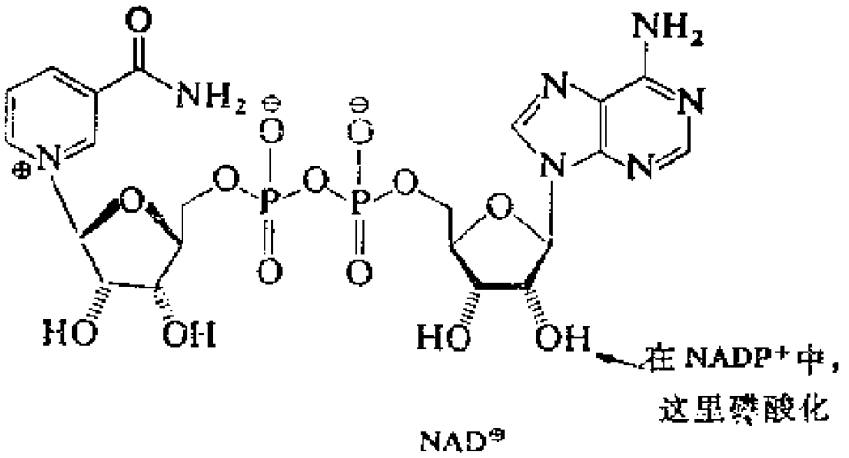
细胞代谢受酶控制。但氨基酸的侧链不能催化生物体系需要的所有化学反应。例如，没有一个侧链是好的电子受体。因此，对于某些反应，酶除了有蛋白部分外，还需要有其它辅助因子——金属离子或非蛋白质小分子有机物。后者称为辅酶(coenzyme)。辅酶在酶反应过程中起着运载底物的电子或某类基团的作用。在反应中，它虽然发生了变化，但是，通过其它酶或其它反应，可重新恢复到原来状态。按照它们和酶结合的紧密程度不同，较牢固地结合在酶的活性部位，成为活性部位的一部分，当再生为原来形式时，也不离开原来酶的活性部位的称为辅基，如血红素是过氧化氢酶的辅基；而那些在反应后能离开酶的活性部位，成为另一个酶的底物，通过其它反应再生成原来形式的称为载体底物或简称为辅酶，如脱氢酶中的 NAD^+ 和 $NADP^+$ 等。辅酶的化学较为特别，常被称为“天然的特殊试剂”。同时，由于它们结构明确，因此也便于进行结构-功能关系的研究。

辅酶的种类很多。本章将以常见的六种辅酶为例，讨论它们的化学及有关的模型设计。

6.1　NAD^+和$NADP^+$

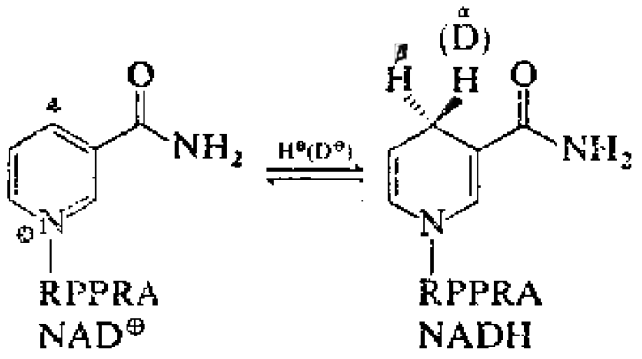
NAD^+和 $NADP^+$ 是指烟酰胺腺嘌呤二核苷酸及其磷酸酯，也可称为辅酶Ⅰ和辅酶Ⅱ。由于其能抗糙皮病，因此称为抗糙皮病因子或维生素 PP。由 Warburg 于 1935 年首先确定其结构。

NAD^+ 和 $NADP^+$ 是脱氢酶的辅酶。脱氢酶是指催化氢原



NAD⊕

子从一个底物转移到另一个底物中的酶。某些脱氢酶同时含有 Zn^{2+} 离子。脱氢酶的作用是立体专一的，这在第一章已作了介绍。不同的脱氢酶，专一性也不同。醇脱氢酶可使 NAD^+ 在吡啶环的re-面接受氢(或氘)，成为氢处图6-1中α-位（C_4位）的NADH，或者说，可使 NADH 发生 pro-R 氢（或氘）的转移；而谷氨酸脱氢酶则从吡啶环Si-面接受氢，成为氢处 β- 位的NADH，或者说，可使NADH发生 pro-S 氢的转移。因此，可将脱氢酶分为两类：一类对辅酶的专一性同醇脱氢酶，称为A型脱氢酶；另一类对辅酶的专一性同谷氨酸脱氢酶，称为B型脱氢酶（见表 6-1）。



RPPRA = 核糖—磷酸—磷酸—核糖—腺嘌呤

图 6-1 NAD^+ 与 NADH 的转换

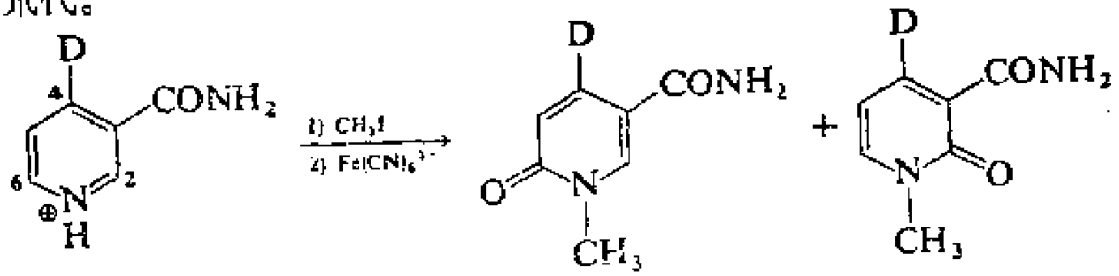
NAD^+还原时反应发生在烟酰胺环上，分子的其余部分只作为与酶结合时分子识别用。关于还原过程中究竟是 H^- 还是质子

表6-1 脱氢酶对辅酶的专一性

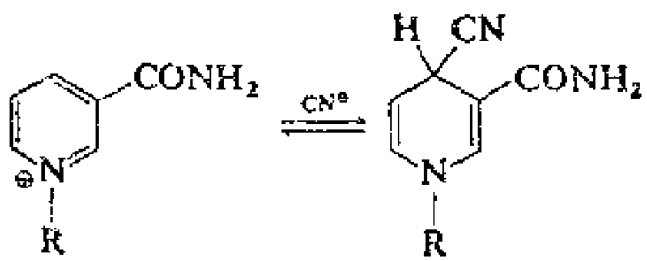
脱氢酶	辅酶	对辅酶的专一性
醇脱氢酶	辅酶 I	A型
乳酸脱氢酶	辅酶 I	A型
苹果酸脱氢酶（可溶性）	辅酶 I	A型
异柠檬酸脱氢酶	辅酶 II	A型
谷氨酸脱氢酶	辅酶 II	B型
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	辅酶 II	B型
3-甘油磷酸脱氢酶	辅酶 I	B型
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	辅酶 I	B型

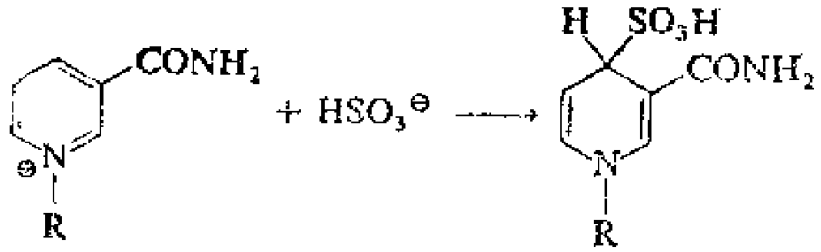
和两个电子的转移，以及烟酰胺环还原时的反应位置问题，曾引起不同的看法和广泛研究。

通过烟酰胺与氘代醇反应得到的氘代吡啶鎓盐的甲基化和氧化结果表明，产物没有失去氘，从而证明了鎓盐只在 C_4 位进行氘代。



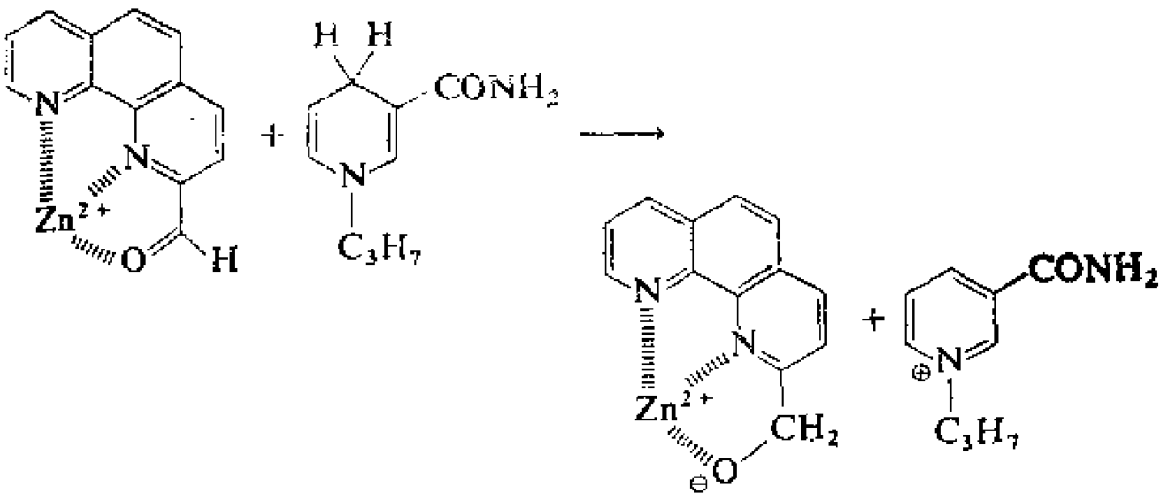
由亲核试剂CN^-和 HSO_3^- 进行的加成反应表明，烟酰胺环的 C_{-4} 位具有亲电的特性。



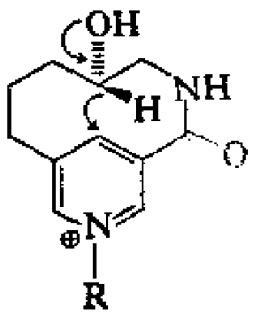


6.1.1 模型化合物

曾有很多工作模拟了 NAD^+ 或 DADH 的反应。1971 年 Oreighton 和 Sigman[1]，合成了N-丙基-1,4-二氢烟酰胺作为NADH的简单模型，并用Zn(Ⅱ)离子催化其对1,10-菲咯啉-2-甲醛的还原反应。反应在乙腈和25℃进行。实验结果表明，Zn(Ⅱ)离子的存在对反应的催化是重要的，说明了金属离子对底物的配位是发生还原反应的推动力。

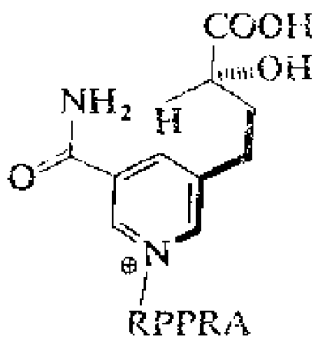


这是非酶体系中醛被 NADH 类似物还原的第一个例子。当用1-丙基-4,4-二氘代烟酰胺反应时，可产生单氘代的 1,10-菲咯啉-2-甲醇。这说明产物是由 $H^-(D^-)$ 从还原型辅酶类似物直接转移产生的。

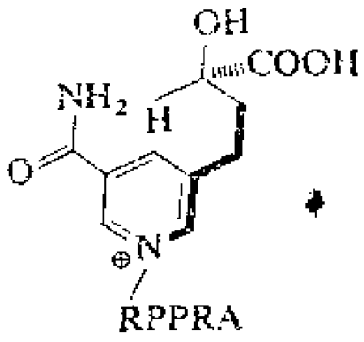


奇怪的是，如果用左列模型模拟NAD^+的还原反应时，没有反应发生。在此体系中，虽然接近效应等有利因素存在，但体系

仍保留环的芳香性。因而可以认为，NADH 在酶体系中的生成可能与底物和NAD⁺之间特定的空间关系有关，或者说，底物某一特定的构型和构象促进反应向非芳香性环方向进行。正如在1978年，德国一小组[2]合成了两个对映的 NAD^+ 和乳酸构成的辅酶-底物共价类似物，并进行了分子内氧化还原反应的观察。实



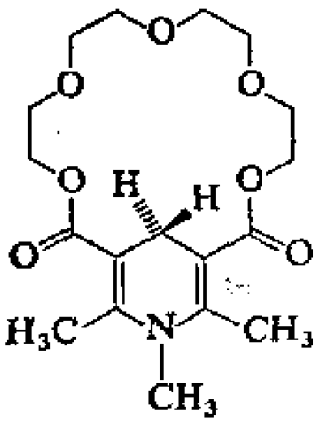
S-异构体

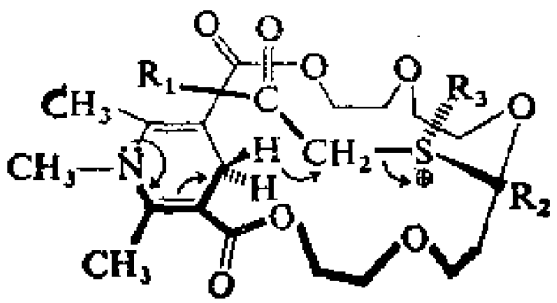


R-异构体

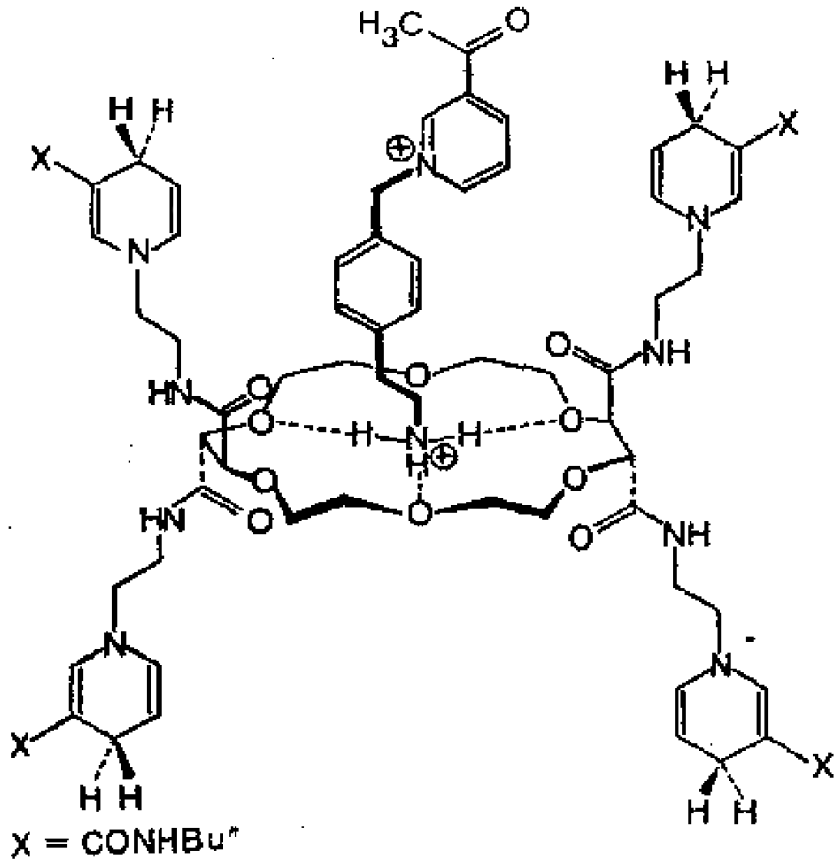
验结果表明，在猪心乳酸脱氢酶存在下，只是 S-异构体发生了分子内的H^-转移，生成丙酮酸和二氢烟酰胺的共价类似物。

利用冠醚作为母体骨架合成的 NADH 类似物在还原反应中显示了比一般还原反应较强的还原能力。这些冠醚起到了脱氢酶的接近、定向，从而加速反应的作用。例如下列模拟物[3]在底物锍盐存在时，H^-作为亲核试剂进行 S_N2 反应。H^-的这种转移比没有冠醚环的相应类似物快2700倍。



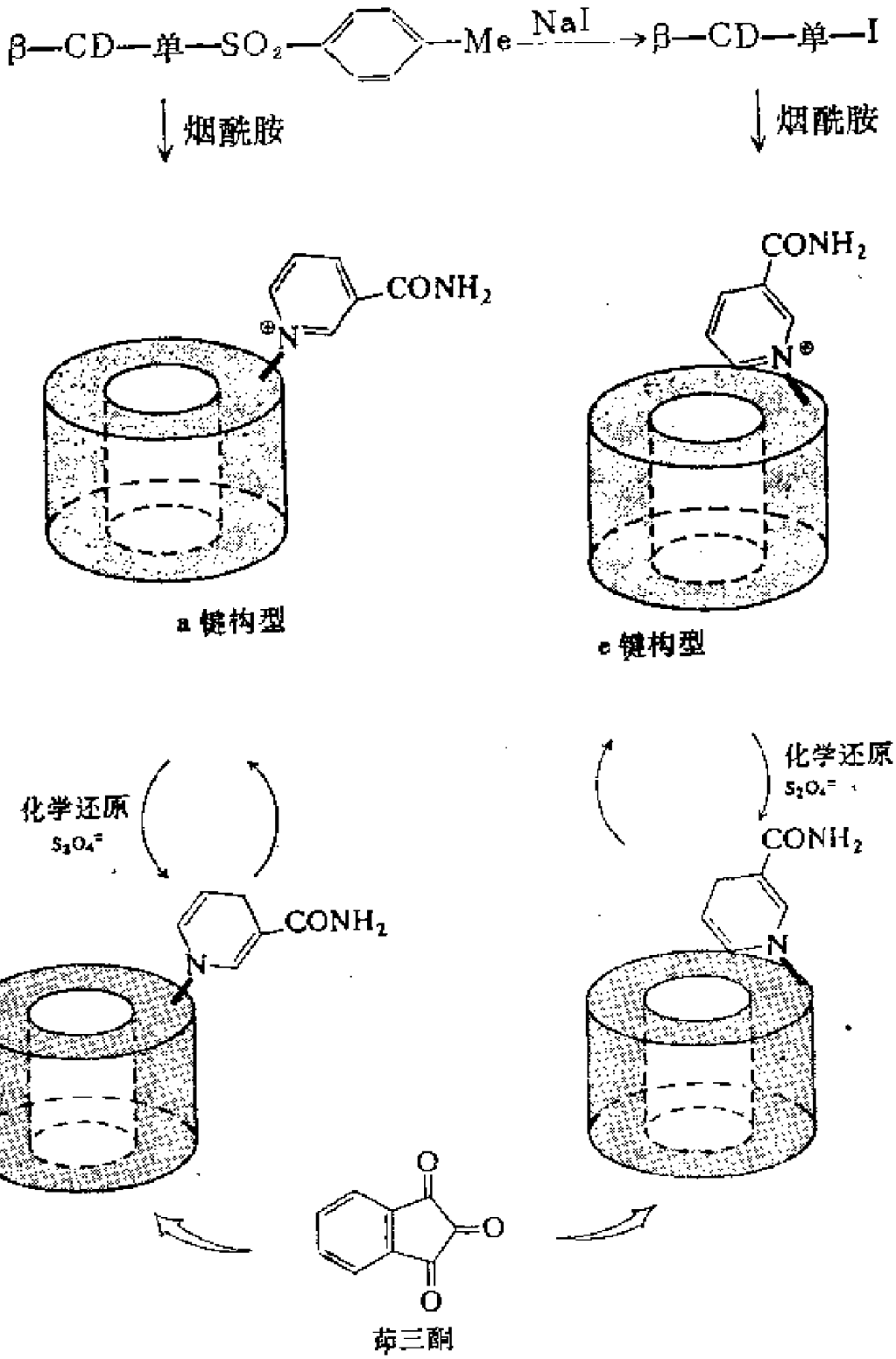


另一个模型是由J.M. Lehn小组制备的一个酮的吡啶盐（底物）和有四个二氢烟酰胺衍生物作为侧链的手性冠醚分子之间形成的复合物。在这个复合物中观察到，氢转移给吡啶盐底物羰基的速度有所增加。这样一种合成催化剂显示了分子催化剂应有的某些特征：既提供了底物结合的受体位置；又提供了为结合的底物发生变化的反应位置。因而，作为酶的模型和新的、有选择性的化学试剂，它都是有价值的[4]。



含有环糊精单位的模型同样被应用。例如，Kojima 制备了二个β-环糊精-烟酰胺衍生物：在二级羟基位置上，一个是竖键，一个是横键的异构体[5]。与 NADH 相比，此衍生物能以60倍的速度还原芳香酮——-茚三酮。类似酶的饱和动力学表明，反应包括了茚三酮与此衍生物之间的主-客体络合。

当设计辅酶的模型时，检查相应酶的结构是重要的。马肝醇



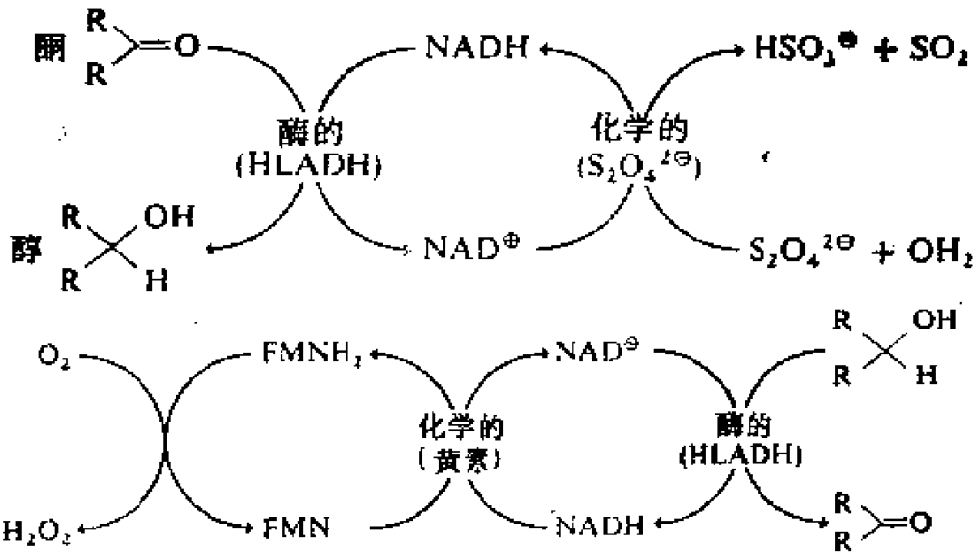
脱氢酶的三维结构已被解析[6]。此酶的分子量为8万，是两个

相同亚单位组成的二元体。每个亚单位由374个氨基酸的单股多肽链组成，并又分成两个分开的区域，每个区域与一个特殊功能相关：一个是结合辅酶（NAD^+）区域，NAD^+的腺嘌呤部分被定位在它的疏水袋中；另一个区域是催化区域，用来结合不同的底物分子。在此区域中，三个残基Cys-46，His-37和Cys-174是起催化作用的Zn原子的配体。有趣的是，在此区域中存在第二个锌原子，它与另四个半胱氨酸配位。这个额外的锌原子的功能还不清楚，但可能对酶的结构的稳定是必要的。以上两个区域被一个裂缝分开。此裂缝中含有一个宽而深的疏水口袋，口袋底部连有催化的锌(Ⅱ)离子。很明显，此体系比以前所想的复杂得多，因为辅酶和底物是结合在酶的不同区域。因此，将来设计依赖NAD^+的酶的模型时，必须将这些观察考虑在内。

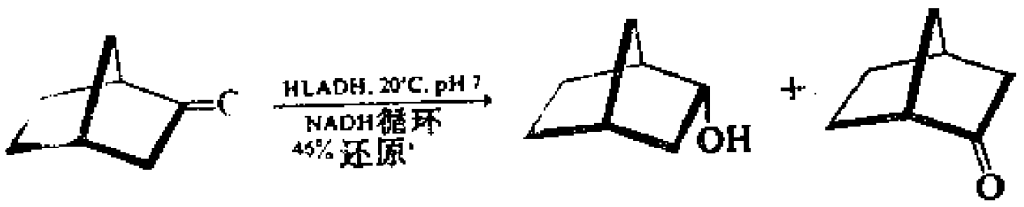
对于H^-转移机理，Hamilton提出了异议。他认为直接的H^-转移发生在脱氢酶的反应中，这在生物学上是异常的，因为质子转移应该有利得多[7]。但是，在这两种可能性之间进行区别不是一件简单的工作，因此一般简单地只提转移两个电子。

6.1.2 辅酶的非酶再循环及在有机合成中的某些应用

近年来，合成化学家对于能影响选择性或不对称合成试剂的需要大大增加。酶在这方面可提供很多独特的机会。目前得到较多利用的氧化还原酶是马肝醇脱氢酶（HLADH）。此酶在酮和醇的立体选择性氧化还原反应中的应用被广泛研究。此酶所需的$NAD^{\oplus}$辅酶很昂贵(每摩尔NAD^+需25万美元)，因此Jones[8—10]研究了连续再生催化量的烟酰胺辅酶的方法。此法用连二亚硫酸钠，从$NAD^{\oplus}$再生NADH。由HLADH催化的很多醛酮还原反应，显示了高收率的制备价值。对于相反途径（醇氧化成酮），体系需要连上黄素辅酶（$FMNH_2$≥FMN），体系中的氧分子还原成过氧化氢。



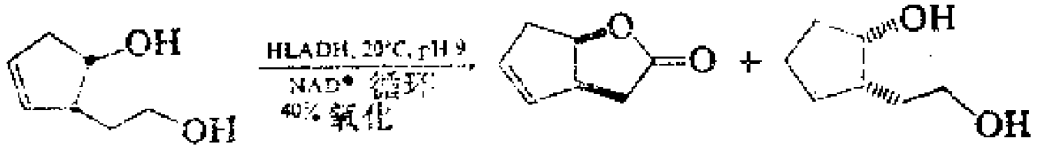
以下是运用 HLADH 作为手性氧化还原催化剂的两个实例：



(±)2-降冰片烷酮

2-降冰片烷醇
(+)-(1S,2R,4R)-型
64% 光学纯度
39% 收率

(—)-(1R,4S)-2-降冰片烷酮
47%光学纯度
31%收率



(±)二羟基环戊烯

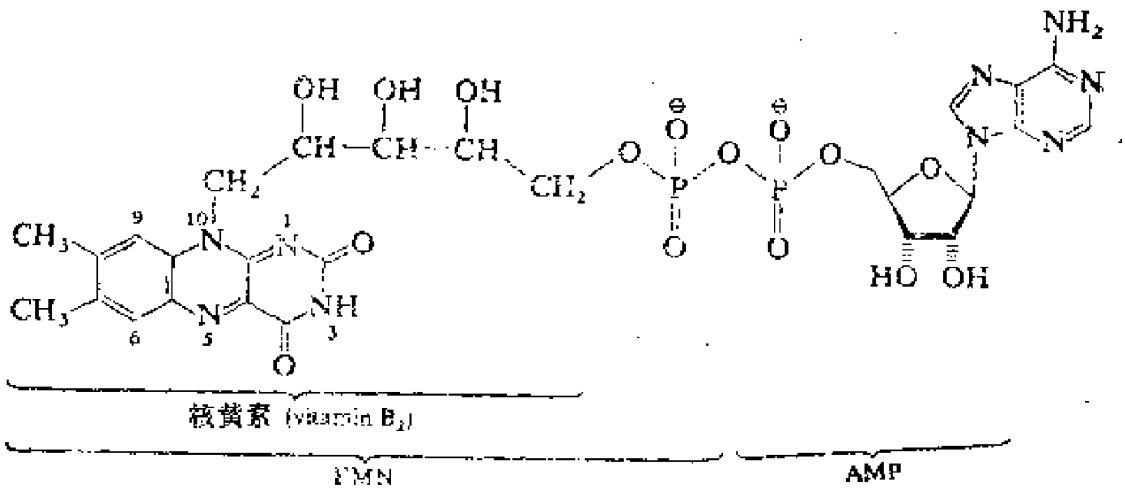
(+)-(1R,2S)
49% 光学纯度
48% 收率

(—)-(1S,2R)
23% 光学纯度
35% 收率

对于以上立体化学结果，Prolog 提出了“金刚石晶格截面图”的方法进行解释，详情参阅文献[8、9]。近年来，Jones 等还提出了“立方体空间截面模型”用于预测 HLADH 催化的有机酮氧化还原反应的专一性[11]。

6.2 FAD

核黄素（即VB_2）的结构中含有二甲基异咯嗪和核醇两部分。核黄素可以两种辅酶形式存在，即黄素单核苷酸（Flavin Mononucleotide，FMN）和黄素腺嘌呤二核苷酸（Flavin Adeninedinucleotide，FAD）。



FAD

在生物氧化呼吸链中的黄素蛋白（氧化酶）需要FAD为辅酶。FAD接受来自NADH的二个电子（相当一个H^-离子），并传递给细胞色素，最后，氧分子被还原生成水。

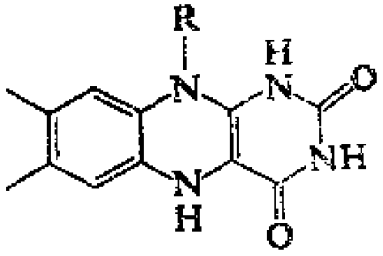
$$NADH+FAD \overset{H^+}{\rightleftharpoons} NAD^{\oplus}+FADH_2$$

FAD除了在加氢-脱氢的过程中起作用外，还可作为单加氧酶的辅酶，将氧分子中的一个氧加入到底物中，因此FAD的作用比$NAD^{\oplus}$更多样化，这与异咯嗪的结构的多样性有关。

6.2.1 FAD参与的加氢-脱氢反应

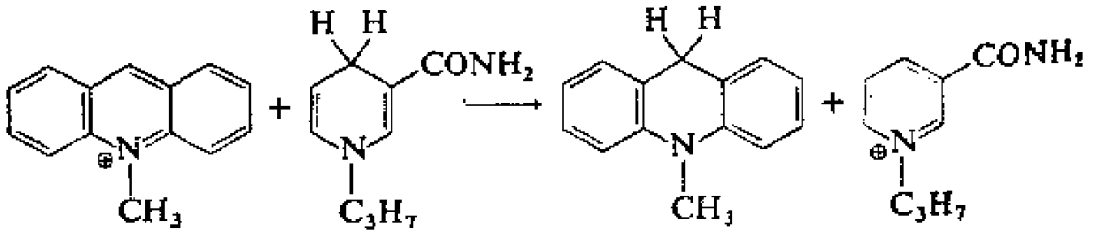
来自NADH的H^-离子进入FAD的什么位置？$FADH_2$形

成的机理是怎样的？这是人们关心的问题。由 $FADH_2$ 的结构已知，N_1和N_5上分别多了一个氢原子。这两个氢原子来自何方？是介质还是NADH？1973年Sigman曾用芳香类似物N-甲基吖啶鎓盐与 NADH（或 d-4 NADH）反应。实验结果表明能发生 NADH 中的H^-的直接转移[12]。

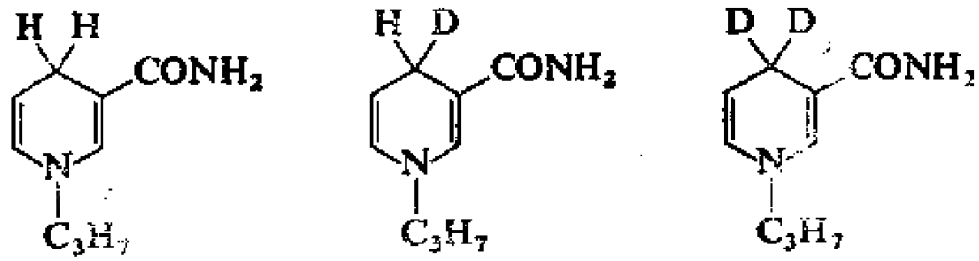


$FADH_2$

但是可逆反应不发生。游离基的抑制剂不影响反应速率，提示反



应是离子型而不是游离基的机理。但是，用氘代 NADH 反应时的二级同位素效应表明，用 FAD 的反应不是简单的双分子过程。几种NADH衍生物脱H^-的反应速率常数如下：

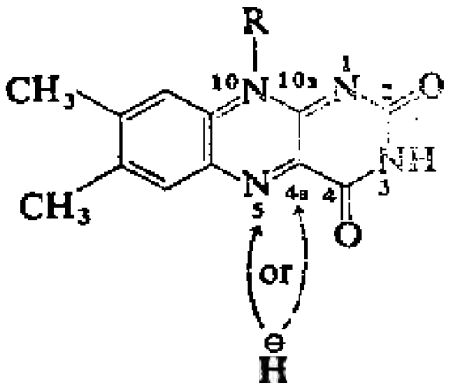


C4脱H^-的速率常数K $mol^{-1}\cdot L\cdot s^{-1}$	2940	1620	1398

由以上结果可计算得到0.74的二级同位素效应。已知一个 SP^3-杂化碳转成SP^2杂化状态时，应得到大于 1 的二级重氢效应。这说明反应不是一个简单的双分子过程。因而必须假设一个动力学

上重要的中间体来说明此实验事实。

目前有一种所谓的 PPC（质子、质子、共价键化合物）理论，说明FAD和底物之间生成了共价化合物的中间体[7]。因为反应是离子型的，在 FAD 的异咯嗪环上必须有一个亲电的位置容易被亲核的底物进攻。检查异咯嗪的环可看出有四个可被进攻的潜在位置。其中 4a 应该是最活泼的亲电性位置，其活性可受邻近酰胺和脒基的诱导效应影响而有些增加。



可能的亲电位置

2 位（尿素类型）

4 位（酰胺类型）

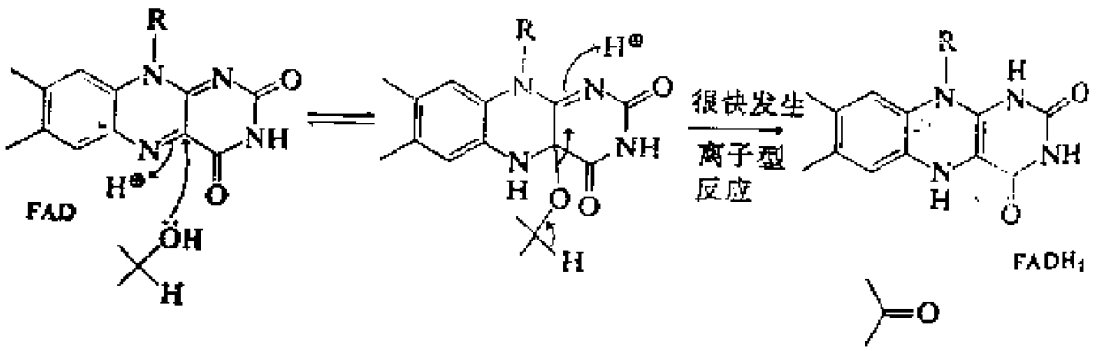
10 a 位（脒基类型）

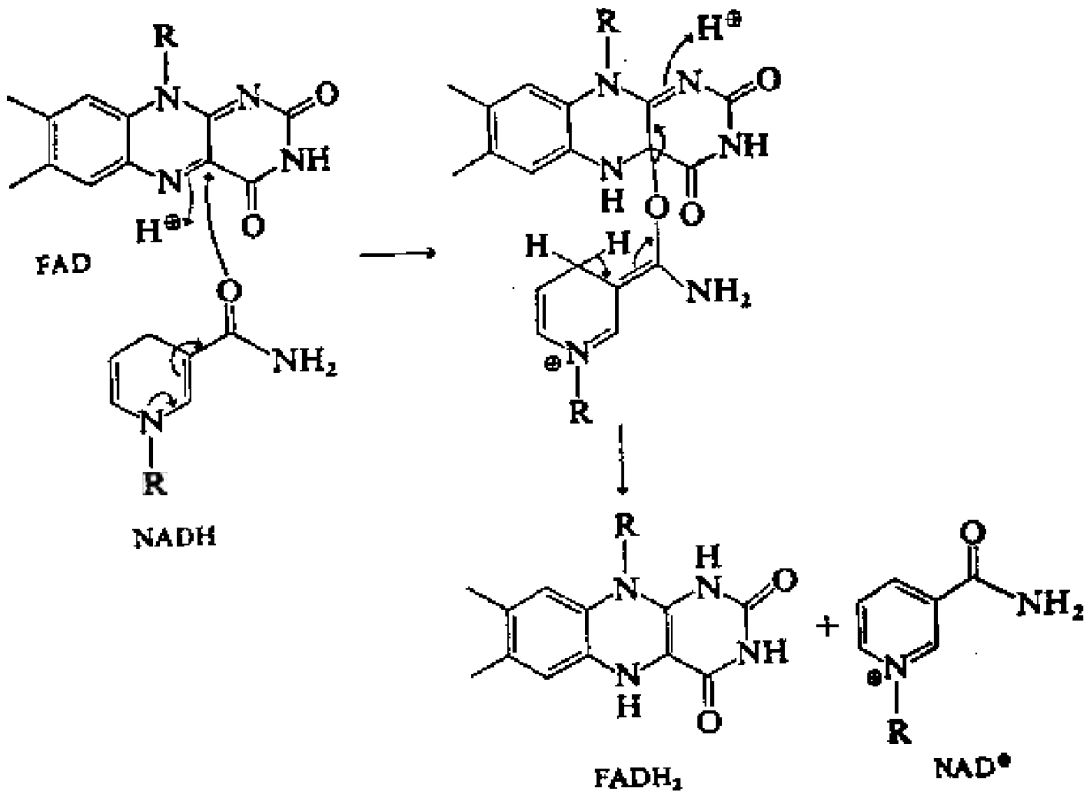
4 a 位（Shiff碱碳）

有两个已知的例子可说明PPC机理的反应。一个是醇经 FAD 氧化成酮；另一个是 NADH 转成 $NAD^{\oplus}$。

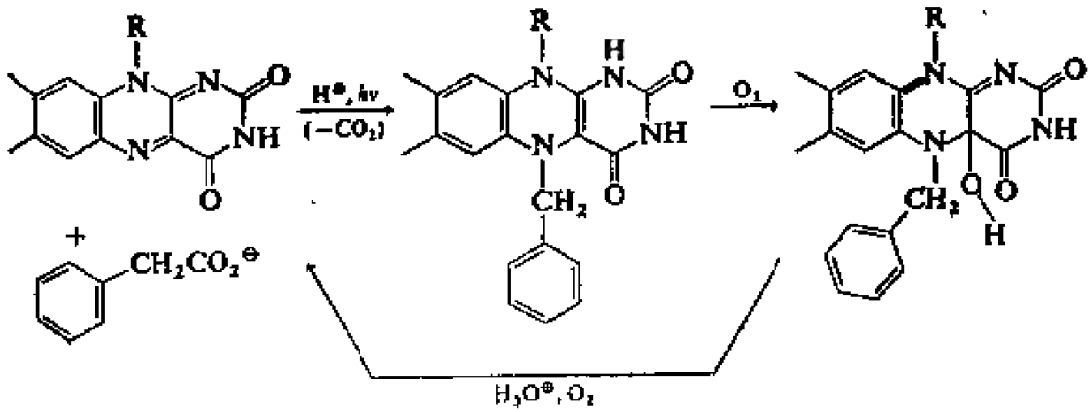
很清楚可看出，上述机理中没有 H^- 转移发生，只在4 a 位通过生成共价中间体发生质子的迁移。提出此机理的 Hamilton 认为，生物体的氧化还原反应很少涉及氢负离子。因为质子不受电荷的屏障作用，在生物介质中的运行会更快、更有效。

关于4a位形成加成物的证据是存在的[13]。如由 FAD 与苯

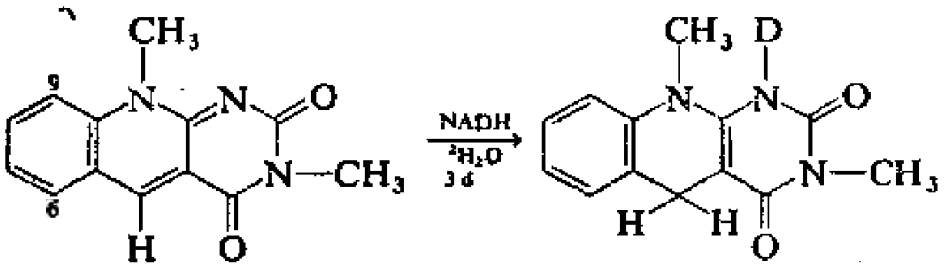




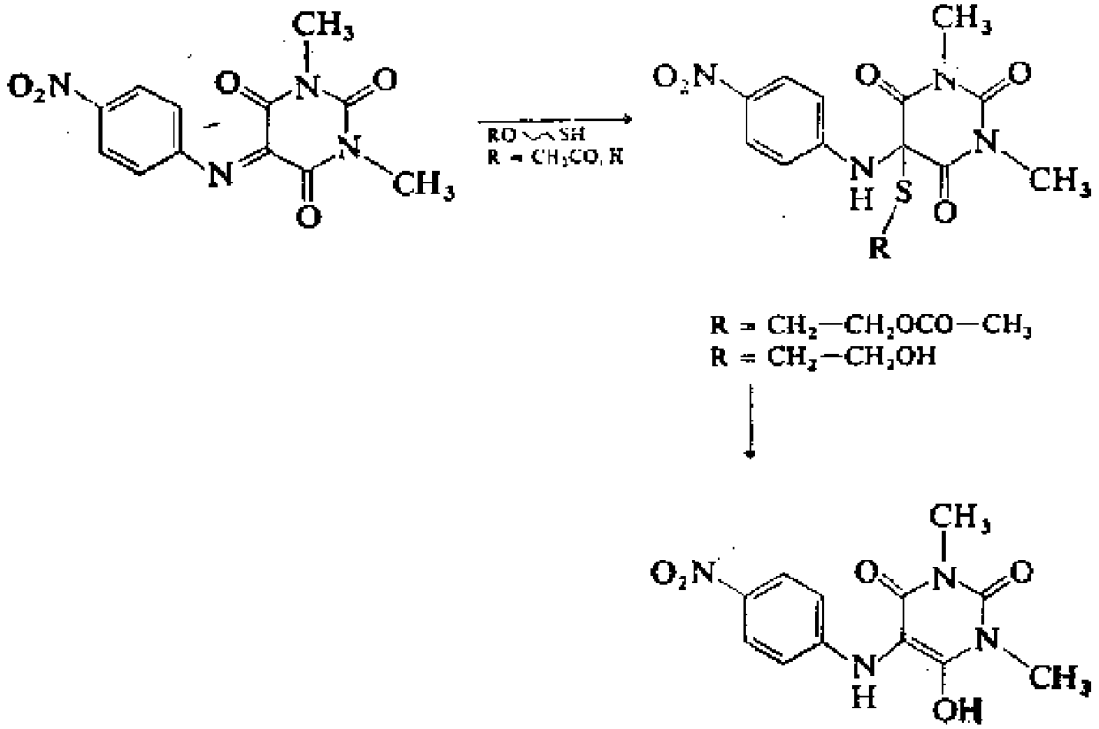
乙酸根在光照下生成的羰基化产物可缓慢地与空气反应生成 4a 位加成物。不过此反应的结果同时又说明了 N5 在反应中的亲电性减弱



Bruice[14] 合成了 5- 位不含氮的模型化合物，并使其与 NADH 在 D_2O 中暗处反应三天，结果得到5-位不含氘的还原产物。此结果显示了氢对5-位能直接转移，同时也显示了5-位的反应活性



但是，Sayer 等在 1979 年用1,3-二甲基-5-（对硝基苯亚胺基-)巴比妥酸作为 FAD 的模型，并与巯基乙醇或甲硫甘醇酸酯反应，结果分离到4a加成的共价中间体



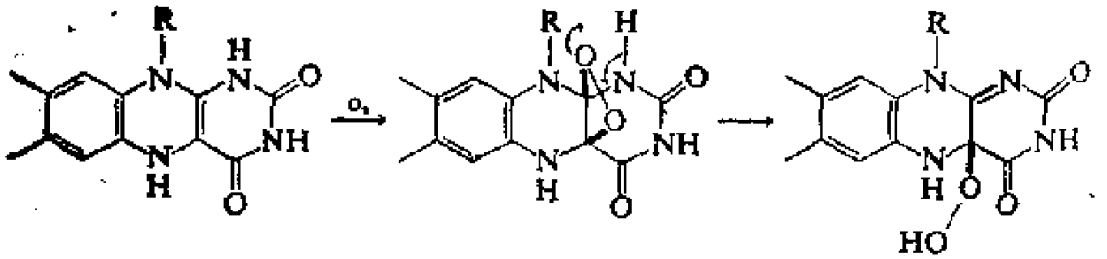
因而，FAD中究竟是4a还是N5是其反应时的确切的亲电位置还没有结论。H^-直接转移的证据也不充分。关于FAD在加氢-脱氢反应中的作用机理目前仍在研究之中，除上面介绍的PPC机理外，还有PPM（质子、质子、金属离子）理论[7]和游离基机理。这里不作详细介绍。

6.2.2 FAD在单加氧酶反应中的作用

许多单加氧酶在氧化反应中需要FAD辅酶。这些氧化反应有对-羟基苯甲酸酯的羟基化、水杨酸盐的氧化脱羧和由混合功能的氨基氧化酶体系调节的各种胺氧化反应。在这些反应中，依赖FAD的单加氧酶结合并活化了分子氧，最后转移一个氧原子到底物中并释放出水。某些酶尚需过渡金属离子。为简单起见，我们只考虑不包括金属离子的机理。

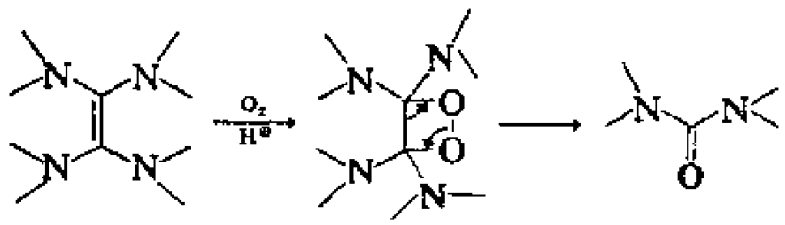
已知有一类单加氧酶不需要金属离子，但必须有FAD（或FMN）作为辅助因子。不需金属离子同样意味着与氧反应的某个阶段可有游离基的特征。

黄素分子如何活化氧分子？目前有人认为还原型的$FADH_2$首先直接与氧反应生成$FADH_2O_2$加成物，此加成物可重排成比过氧化氢更强的氧化剂——黄素4a-过氧化氢。

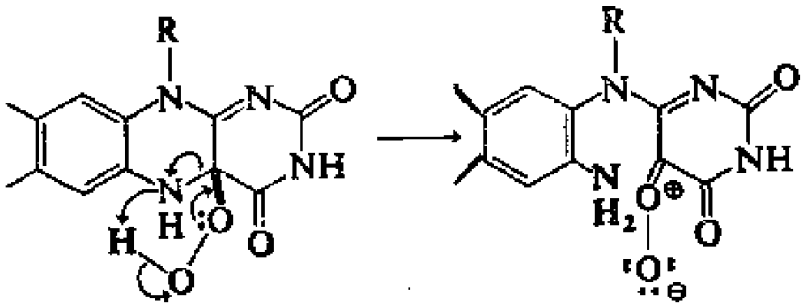


$FADH_2$　　$FADH_2O_2$　　黄素过氧化氢化合物

氧分子加到$FADH_2$上的反应很类似于氧与取代的四氨基乙烯的反应。后者的双键具有很强的给电子能力



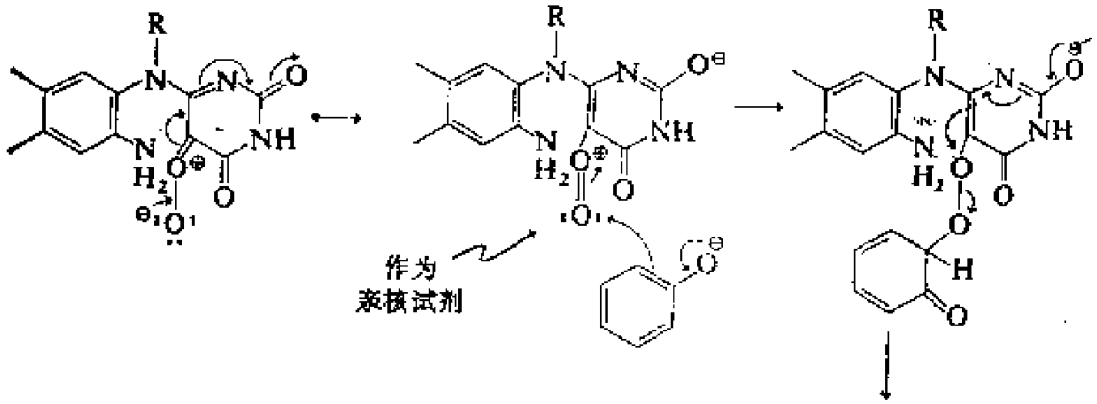
在存在各种还原型黄素的非酶体系中，芳香族化合物(苯酚)可被氧羟基化。对于这个反应结果有不同看法的几种机理。有人认为，羟基化试剂是黄素过氧化氢化合物，它通过一个质子转移的重排给出真正的羟基化试剂——羰基氧化物

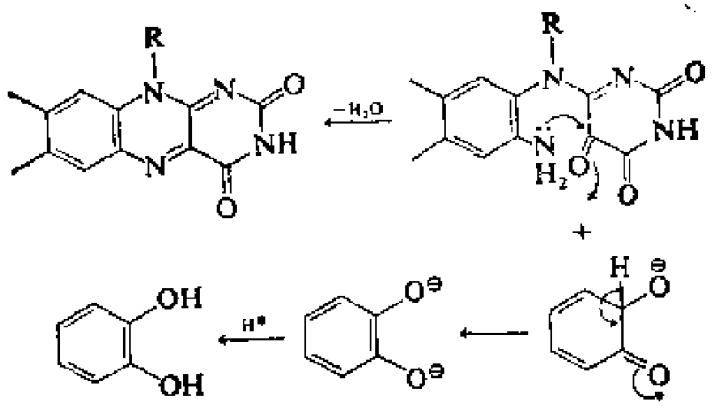


黄素过氧化氢化合物　　羰基氧化物

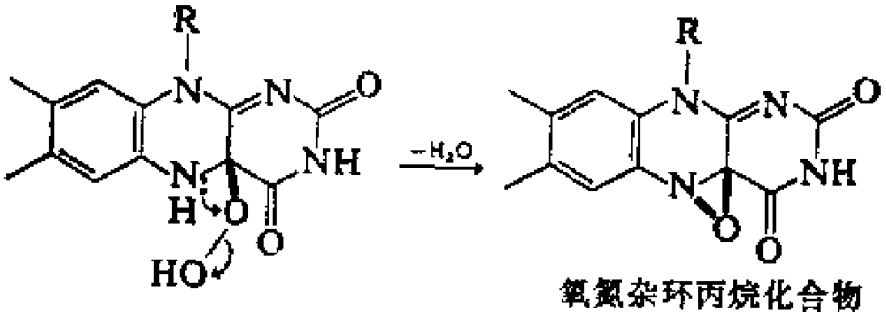
以上机理由 Hamilton 首先提出[7]。此机理的缺点是涉及黄素的开环形式。

为克服 Hamilton 机理的缺陷，Dolphin 在1974年提出了

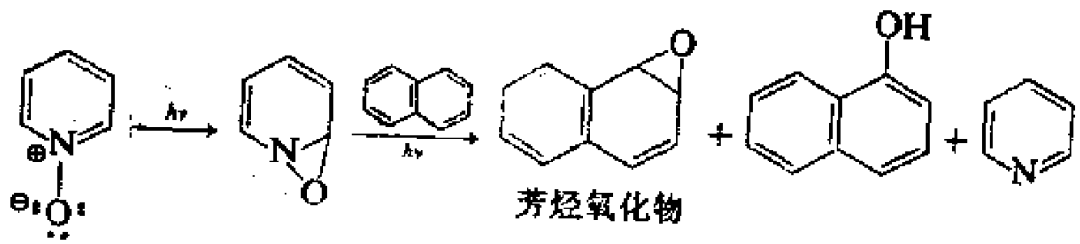




另一个无开环产物中间体生成的机理[16]。此机理涉及由黄素过氧化氢加成物转为活性的氧氮杂环丙烷-4a，5-黄素。

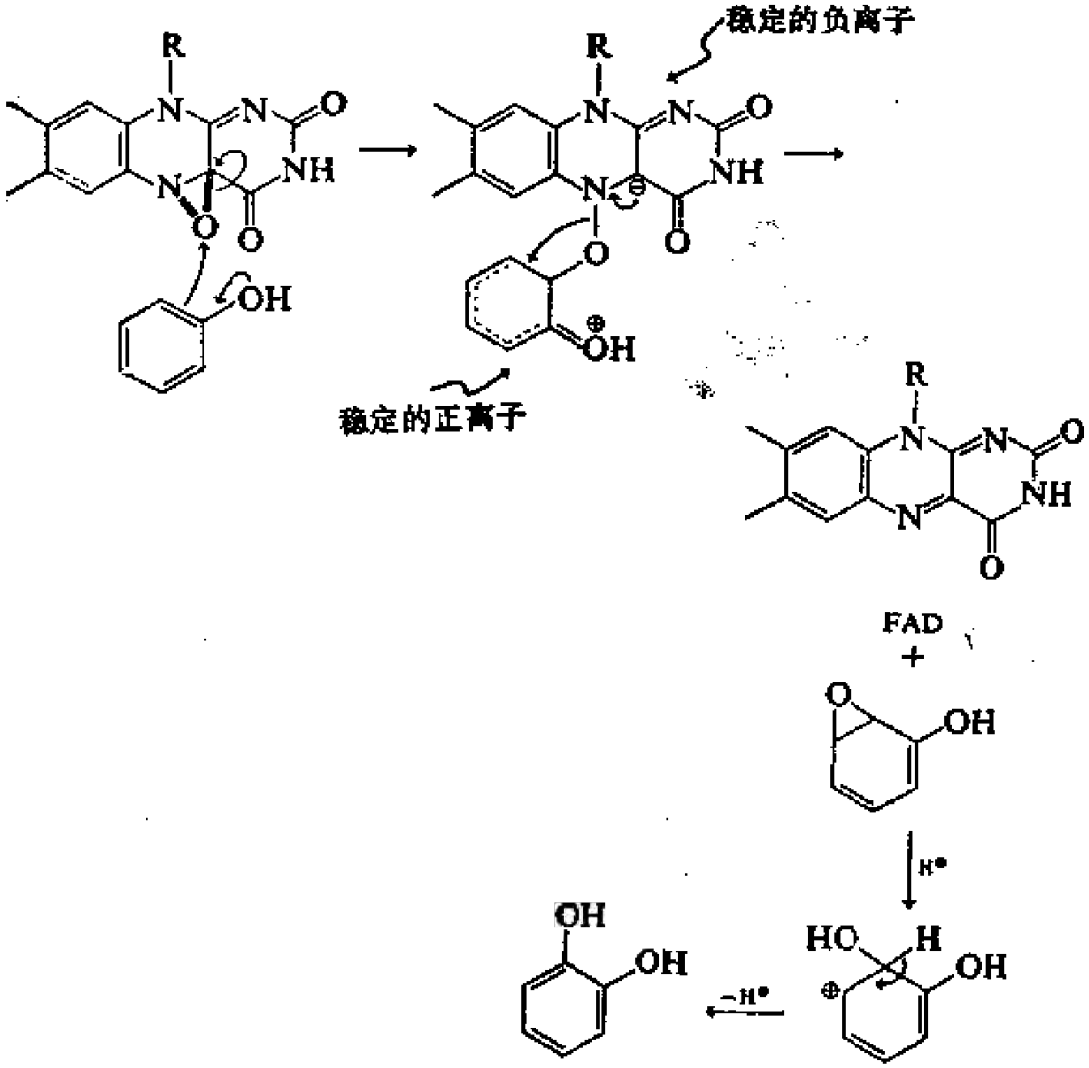


此设想是根据了许多化学先例的。例如，下面的反应显示了氧氮杂环丙烷体系的亲电特征

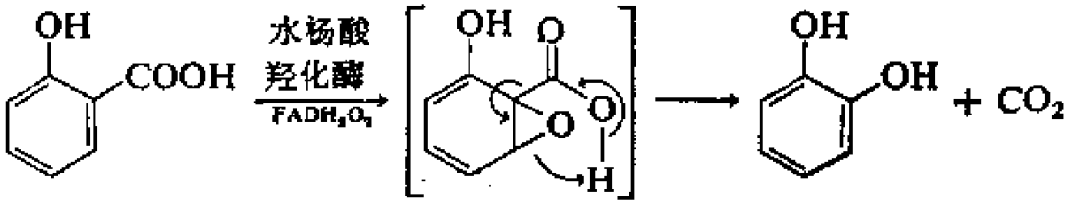


这样，苯酚羟基化的机理被假设如270页所示。

关于苯环氧化物中间体的形式，早在 1969 年已有 Witrkop 提出。他认为在许多单加氧酶催化的芳香化合物的氧化反应中，环

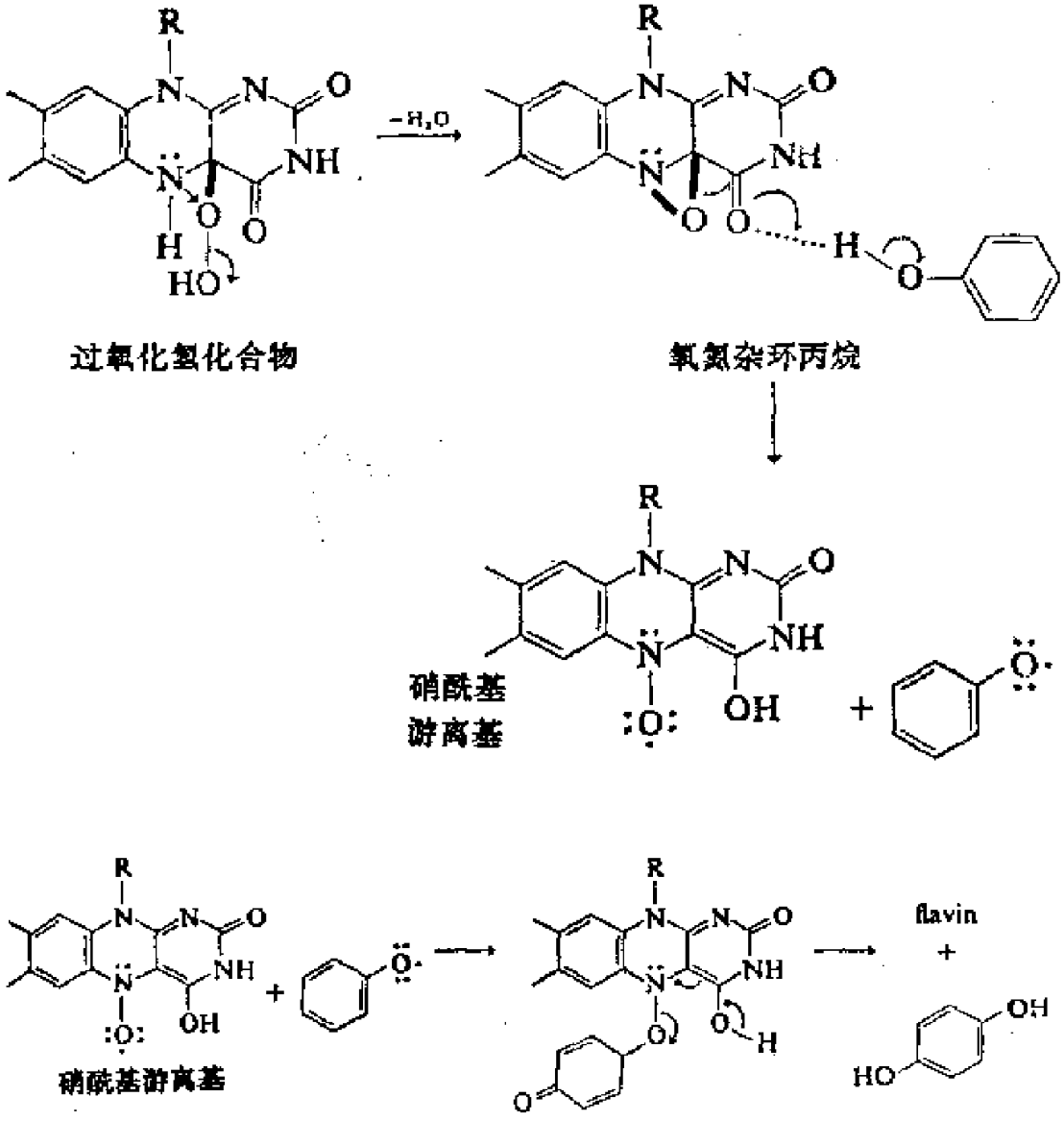


氧化物是中间体[17]。



Rastetter 小组反对 Dolphin 关于由黄素介导的氧化反应经氧氮杂环丙烷机理的看法[15]，因为光化学不能诱发氧在酶促氧化反应中的插入。他们认为由酶结合的黄素 4a-过氧化氢化合物可衍生出硝酰基游离基 (nitroxyl radical) 中间体，此游

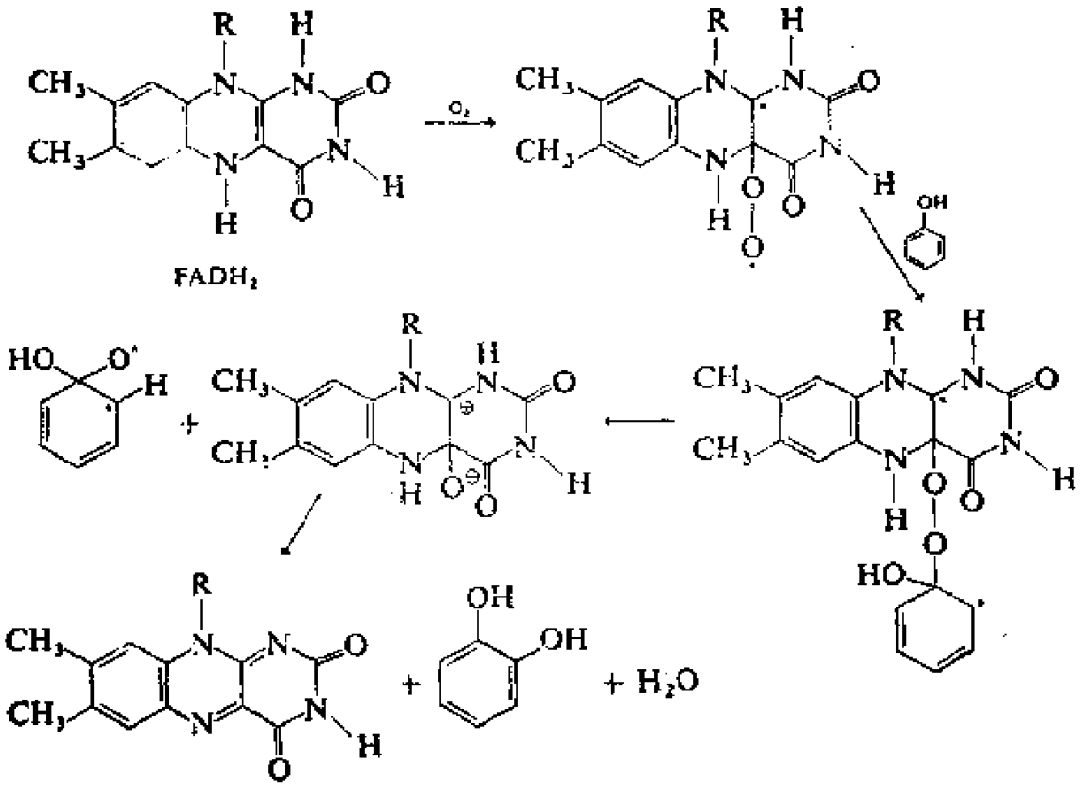
离基可在黄素酶化学中起作用



上述机理避免了氧氮杂环丙烷的环张力。

1978 年 Goddard 又提出了酚类化合物羟基化的另一机理[18]：

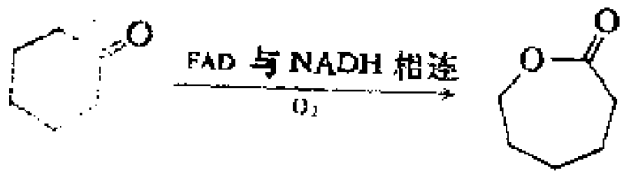
氧化过程的第一步中，三腺态氧进攻黄素，生成双游离基。从某种意义上讲，黄素活化了氧。双游离基的一个未成对电子被黄素环稳定，另一个留在第二步与苯酚反应的氧原子上。这样产生了由



黄素和苯酚通过两个氧原子连接的中间体。然后，黄素分子帮助促进下一步反应。这一步1-位和10-位氮原子上的未共享电子对稳定了中间体的正电荷。按照 Goddard 的观点，黄素中的氮原子帮助断裂氧-氧键，这是反应中能量高的一步。假设的机理涉及到氧原子向苯酚中带有羟基的碳的进攻。按照键的能量计算，这个游离基中间体的能量低于氧与带羟基碳邻近的另一个碳相连的情况。在重排反应中氧再迁移，同时得到产物邻苯二酚，但是黄素仍含有额外的氧。可以相信，此氧可通过获取质子生成水而从黄素中除去。此过程肯定由酶中介。以上假设的证据有待模型研究。

最后，应提到细菌的依赖黄素的环己酮加氧酶。其通过催化二个氧的四电子还原而氧化环己酮。此四电子中的两个来自还原

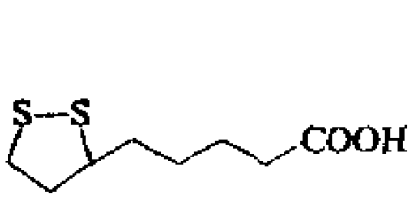
型烟酰胺辅酶，另两个来自底物[19]。这是有机化学中熟知的Baeyer-Villiger反应的极好实例：



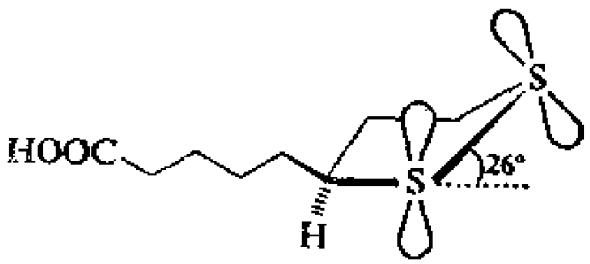
由上述内容可见，FAD的化学比$NAD^{\oplus}$丰富，这与黄素结构中异咯嗪的结构既可进行离子型反应又可进行游离基反应，并能形成加成物等特点有关。

6.3 硫辛酸

硫辛酸（Lipoic acid 1,2-二硫戊环-3-戊酸）广泛分布于微生物、植物和动物中，是属于另一类电子转移的含硫辅助因子。在脂肪酸合成和糖代谢中需要这个辅助因子。



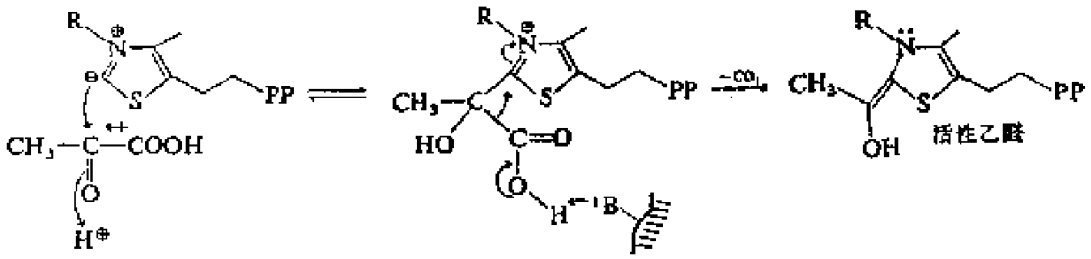
硫辛酸



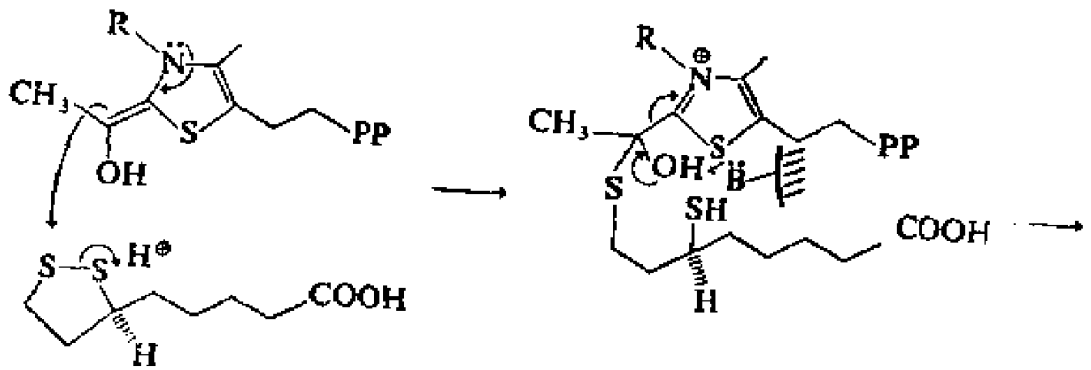
硫辛酸五元环中的碳和硫原子不在同一平面内，而是有26°的C—S—S—C两面角。通常的二硫化物是无色的，但硫辛酸略带黄色，此性质归结于环张力大。环张力的产生与相邻的两个硫原子上的电子对的相互排斥有关。因此，硫辛酸比张力小的五元环类似物容易开环，成为二氢硫辛酸。二氢硫辛酸也极易再氧化成硫辛酸（I_2 或 O_2+M^{n+}）。

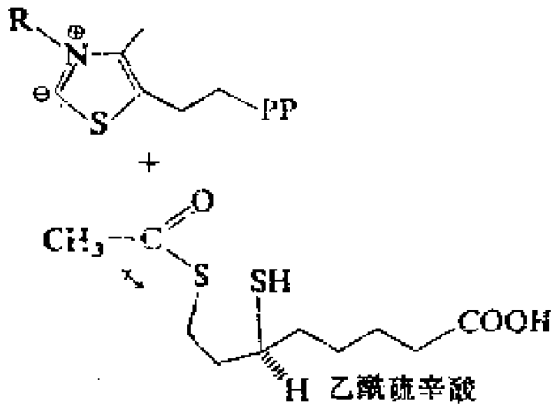
丙酮酸氧化脱羧生成乙酰辅酶A的反应是连系糖酵解和三羧

酸循环的重要环节。反应涉及三个不同的酶和六种辅助因子、即辅酶A、焦磷酸硫胺素(TPP)、硫辛酸、FAD、NAD^+和Mg^{++}。丙酮酸首先在 TPP 和 Mg^{++} 存在下，经丙酮酸脱氢酶（E_1）催化脱去羧基，形成活性乙醛（有关TPP内容见6.5部分）

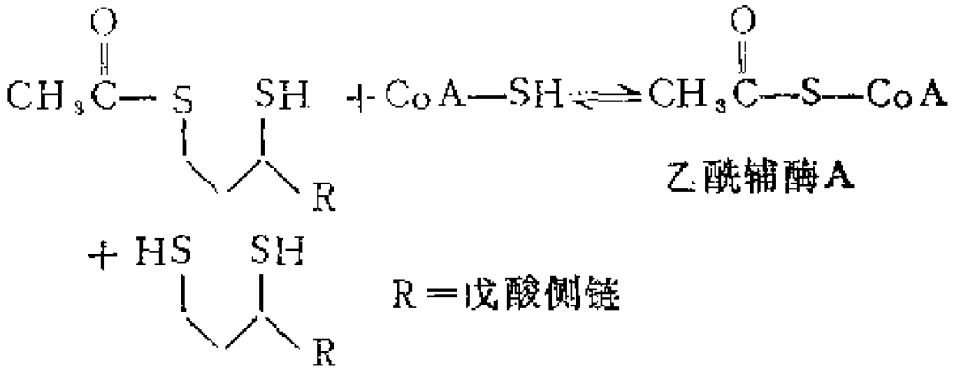


活性乙醛（又称生物乙醛）在硫辛酸、Mg^{++}存在下，由酶(E_1)催化产生乙酰硫辛酸：

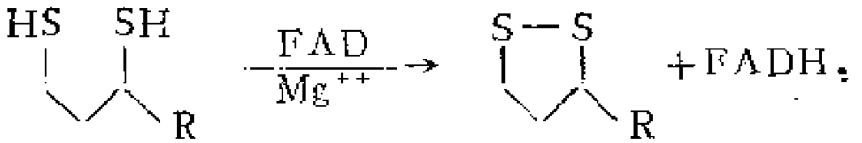




乙酰硫辛酸在辅酶A、Mg^{++}存在下，经二氢硫辛酸转乙酰基酶（E_2）催化形成乙酰辅酶A和二氢硫辛酸



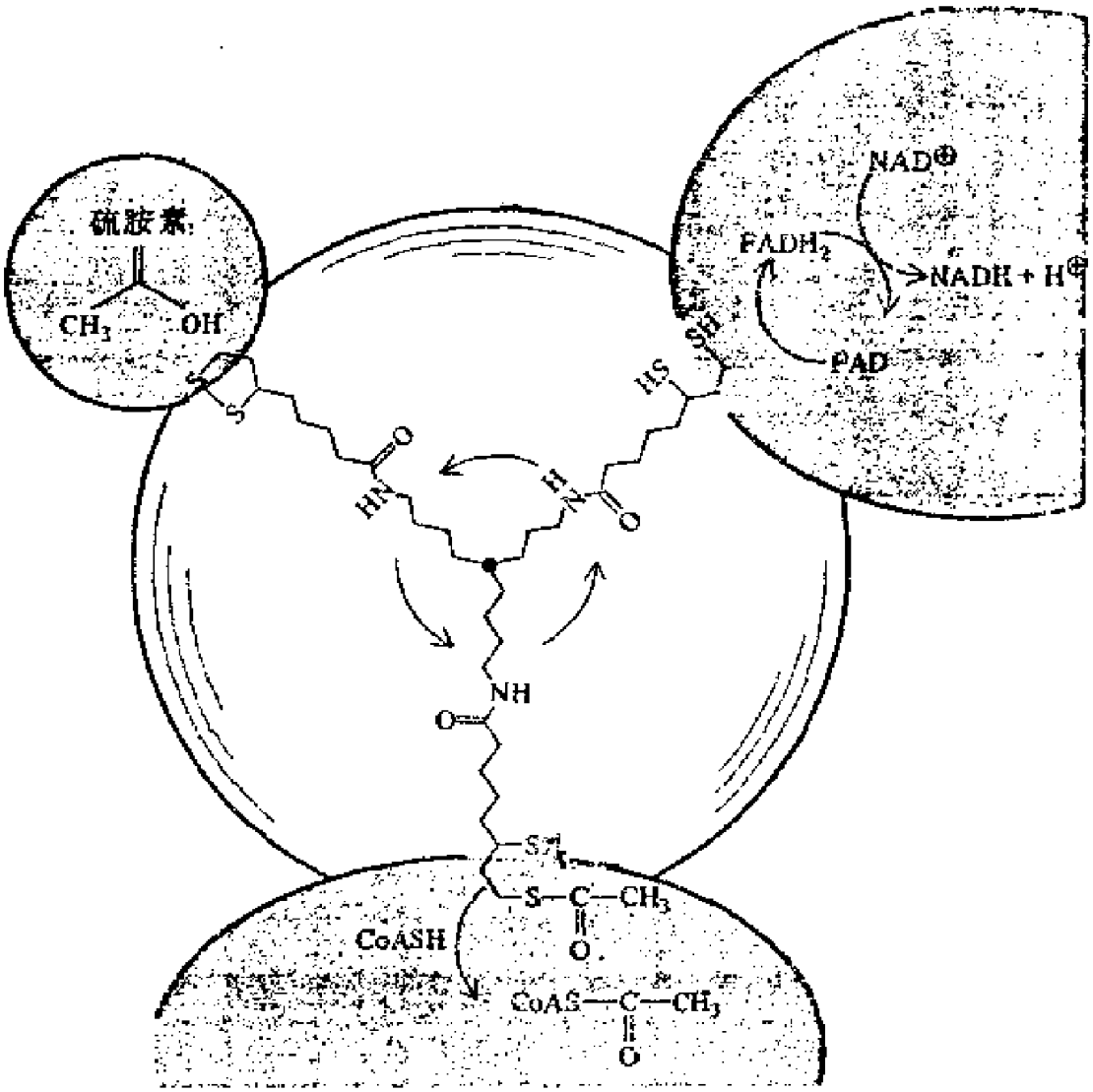
二氢硫辛酸又在FAD、Mg^{++}参与下，经二氢硫辛酸脱氢酶(E_3)催化，再生成硫辛酸



$$FADH_2+NAD^+ \xrightarrow[Mg^{++}]{E_3} FAD+NADH+H^+$$

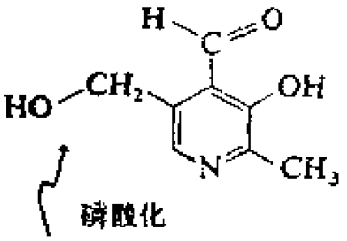
在上述过程中，硫辛酸不是游离的，而是通过酰胺键共价地连接到酶的赖氨酸残基上。丙酮酸氧化脱羧生成乙酰辅酶A的过

程图解如下：

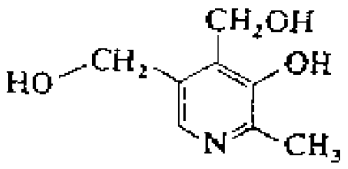


6.4 磷酸吡哆醛

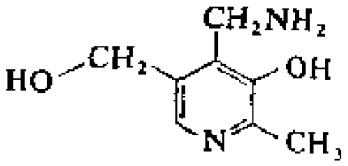
吡哆醇或VB_6是重要的营养必需成份。醛的形式称为吡哆醛。它的磷酸酯参与氨基酸和胺的许多酶催化反应。可以说，磷酸吡哆醛(吡哆醛-P）是自然界中功能最具多样性的一种辅酶。在氮代谢中十分重要的氨基转移反应中，吡哆醛转成吡哆胺。这



吡哆醛

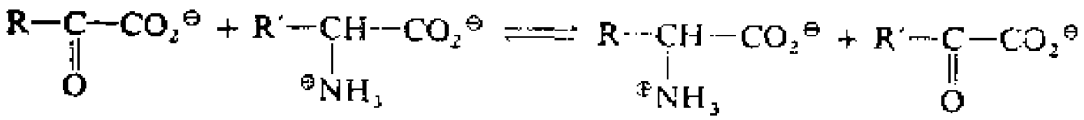


吡哆醇（VB_6）

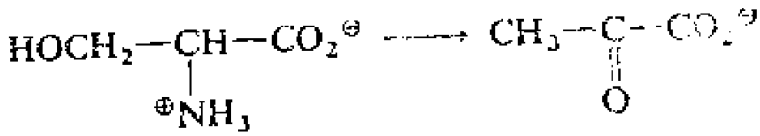


吡哆胺

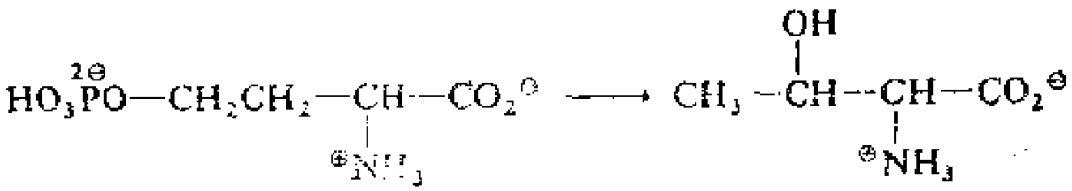
里将强调有关质子转移的化学。吡哆醛-P辅酶至少催化七个很不相同的反应。在这些反应中充分体现了酸-碱化学和互变异构问题。



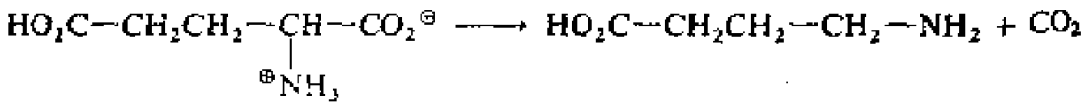
氨基转移反应



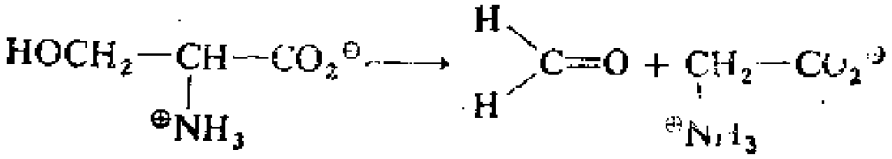
消除-水合反应



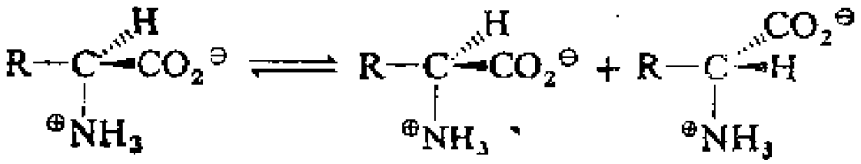
消除-水合反应



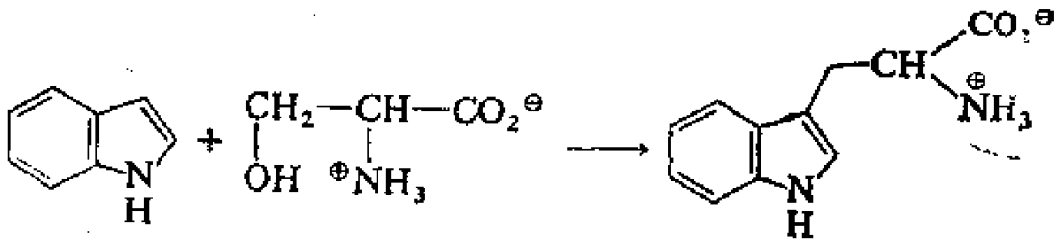
脱羧反应



缩合逆向反应

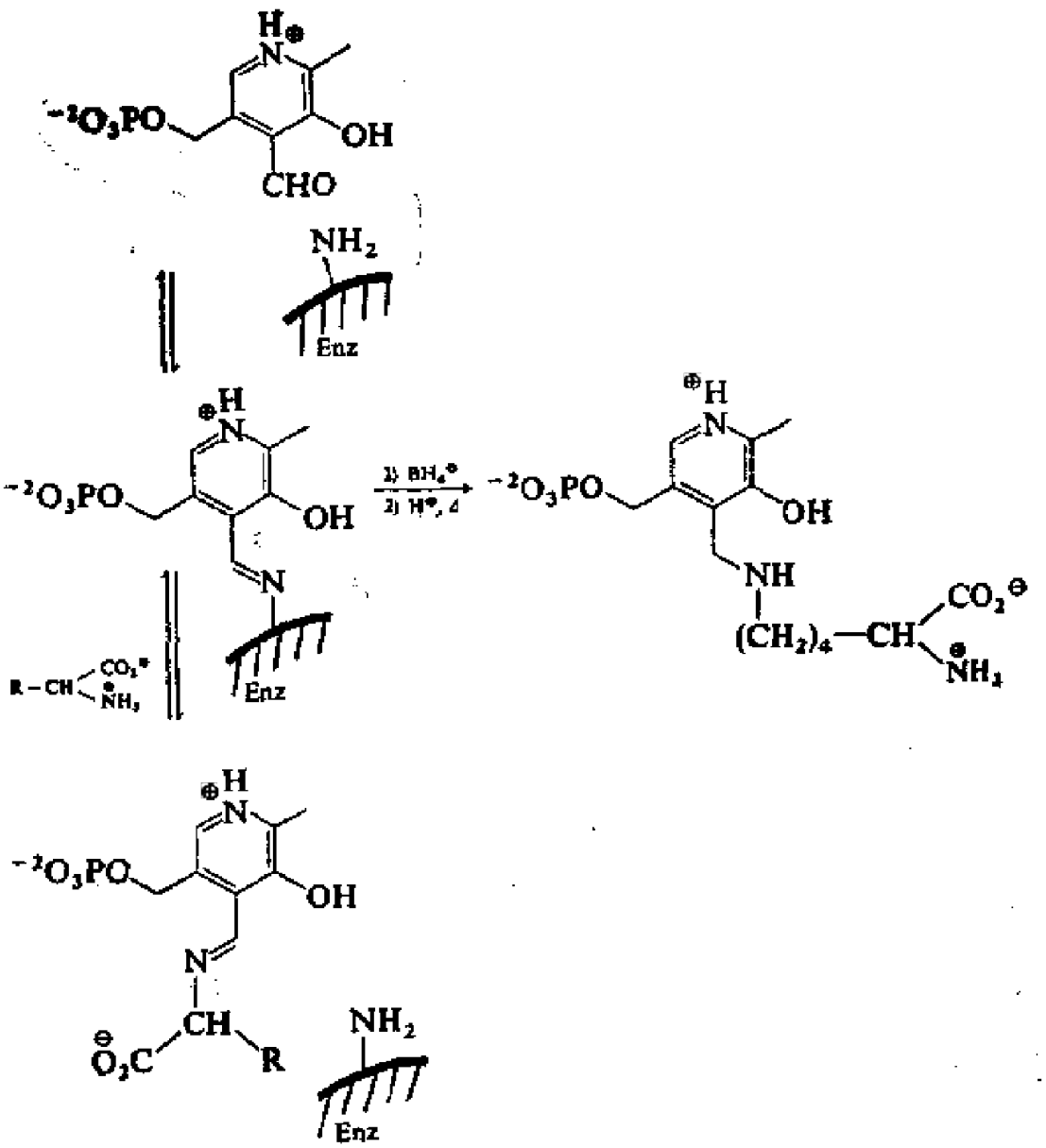


消旋作用

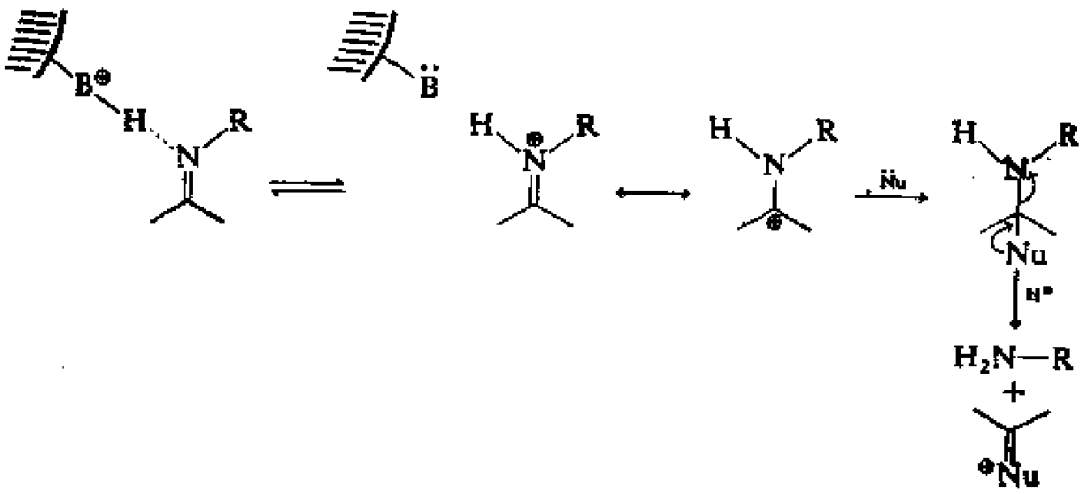


色氨酸的合成

也许人们会奇怪：这些不同的反应为什么会需要相同的辅酶。但当弄清楚这些反应有某些共同特征时就会容易理解了：在吡哆醛-P的醛基和底物的氨基之间都形成了亚胺（Schiff 碱）的结构，吡哆醛 -P 成为亲电的催化剂或电子陷井（electron sink）。因为电子可从氨基酸离域到环结构中。正是这个离域方向支配了反应类型，而且在这里，酶既增加了反应速度，也控制了反应的方向。在氨基转移反应中了解到，吡哆醛-P是先与酶形成酶-亚胺中间体，然后才转为底物-亚胺。证据来自硼氢化物对体系的还原作用。还原产物不是吡哆醇，而是与酶的赖氨酸残基形成共价键的产物。酶与辅酶之间先形成亚胺，提供了更快的反应途径[20]。与吡哆醛 -P 的醛基相比，与酶结合成亚胺的碳

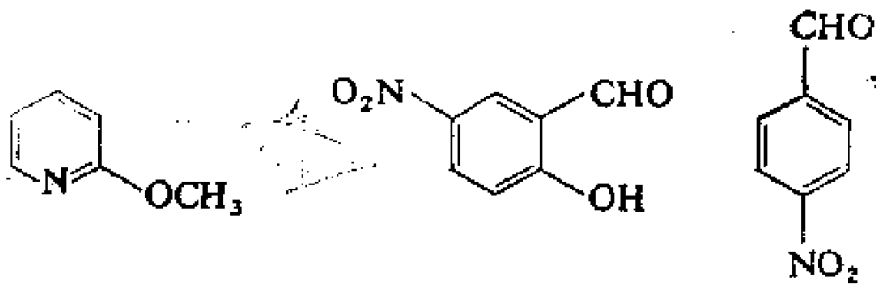


具有较大的反应活性。因为C＝N键中碱性比氧原子强的氮原子能与酶表面上的氢键供体形成较强的氢键，同时也有更大的可能被质子化，因而亚胺的碳在这里比羰基的碳具有更强的正性，更容易被亲核试剂（底物）进攻。

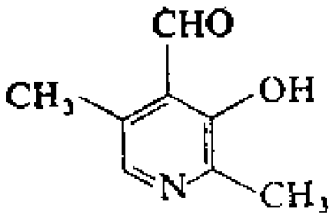


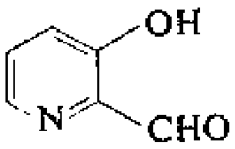
6.4.1 结构与功能

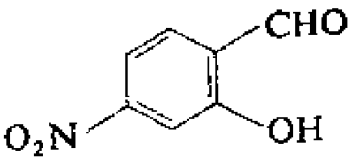
吡哆醛-P有几种结构特征使它成为多样化的辅酶。首先是酚羟基的合适位置，使它成为能提供分子内广义酸碱催化的试剂；第二，吡啶环的正电荷的氮原子可作为亲电的催化剂或电子的陷阱，使电子从氨基酸离域到环上；同时，当环上的氮原子处于非质子化状态时，又可容纳来自环外的正电荷。这种电荷调节作用有利于氨基酸的一系列变化；第三，各种基团都以正好合适的几何形态和相互关系置于酶的表面。例如，已合成了很多吡哆醛的类似物，并在生物体系中进行了观察。已知下列一些化合物是无效的：



但下列化合物为有效的催化剂：


CHO
CH3
OH
N
CH3


OH
N
CHO


CHO
O2N
OH

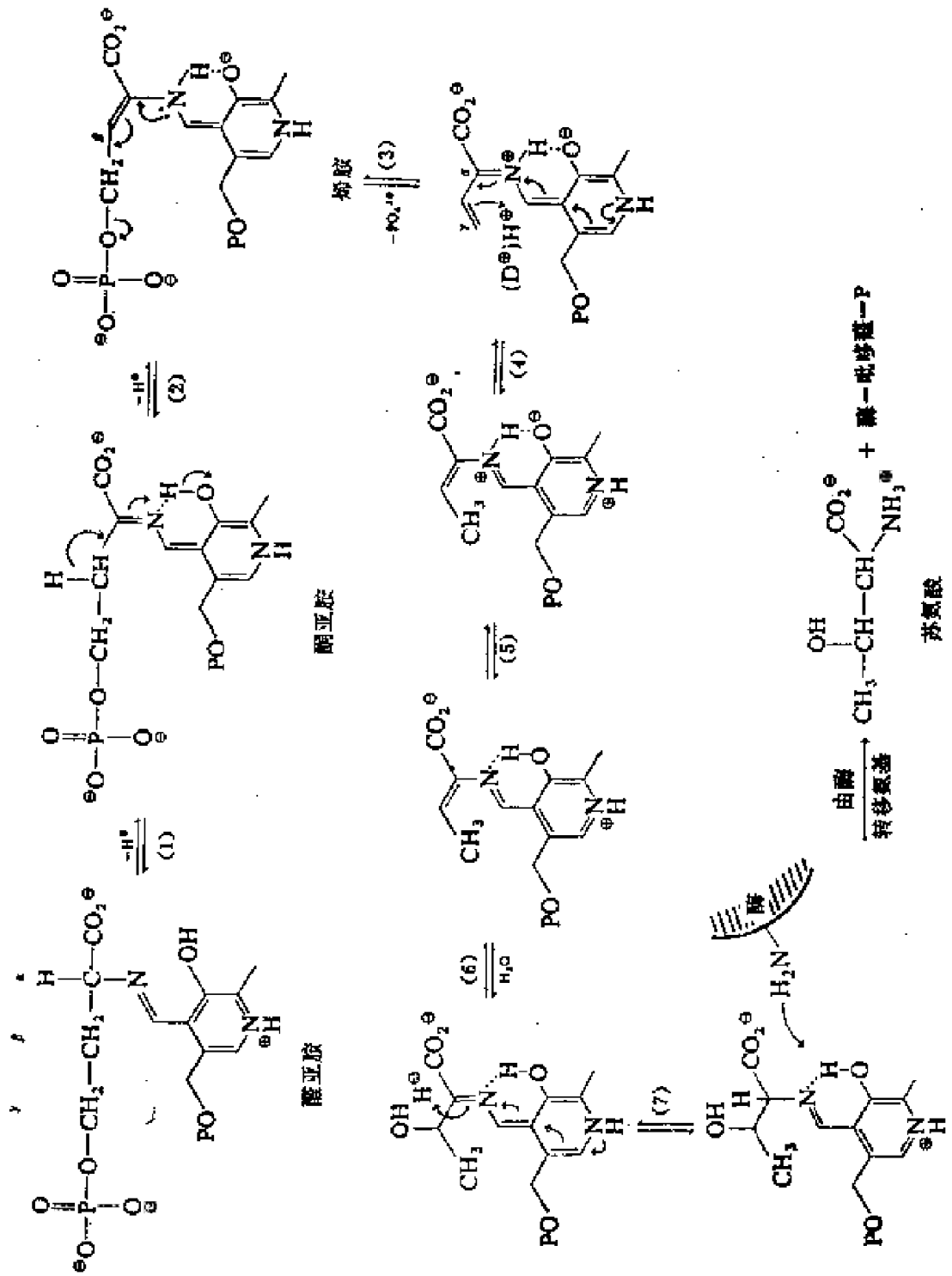
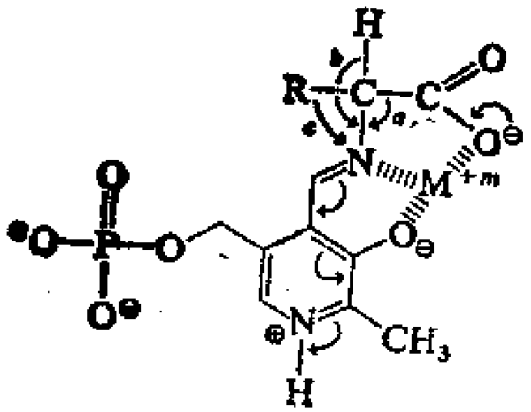


图 6-2　高丝氨酸转成苏氨酸的过程

α-碳负离子中间体（起电子陷井的催化作用），有利于 α-H 的脱去。在酮亚胺中，β-H受亚胺键的影响同样具有酸性，因此可脱氢形成α，β双键，即形成烯胺。烯胺的结构有利于磷酸根的离去，形成β，γ双键，(第三步)，并由于此双键与环上的氮原子间处于共轭的关系。因此富有电荷，容易与H^+结合生成β，γ-双键饱和后的产物。这里，环上的氮原子容纳了 H^+ 的正电荷，成为质子化的$-\overset{+}{\underset{|}{N}}=$状态（第四步）。环上的酚羟基自第二步作为酸性催化剂后，一直是以酚氧基的形式与环外的氮原子上的氢以氢键相连。但当环外的氮原子处于质子化状态时，酚氧基夺取了氮原子上的氢，使质子化的氮原子恢复到三价状态(第五步)。此后，水可对α，β-不饱和化合物进行亲核性加成，同时，环上的$-\overset{+}{\underset{|}{N}}=$可容纳来自水的负电荷，由$-\overset{+}{\underset{|}{N}}=$转成$-\underset{|}{N}-$状态(第六步)。在第七步中，$H^+$又对处于共轭状态的环外C＝N键进行亲电加成，环上的$-\underset{|}{N}-$又容纳了正电荷，转成$-\overset{+}{\underset{|}{N}}=$，即吡哆醛P-与苏氨酸的亚胺共价结合物。最后，由酶上赖氨酸残基的氨基进攻以上化合物，形成酶-吡哆醛-P的亚胺结合物，释放出产物苏氨酸。在以上过程中可看出，由于Schiff碱的形成，可使氨基酸的α，β，γ-碳表现出碳正离子或碳负离子的特性。环上的酚羟基的酸性及环中氮原子的共振稳定作用起了广义酸或碱的催化作用。

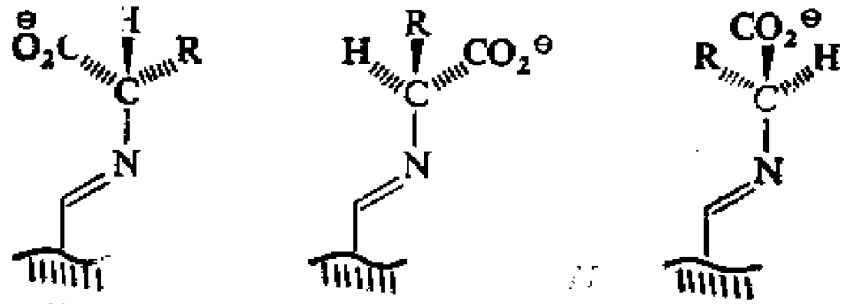
由吡哆醛-P参与的氨基酸一系列反应中，可根据酶的类型，酶-辅酶复合物能从底物氨基酸中除去R-基、羧基或α-氢。同时了解到，辅酶键合的底物的构象有着很大的影响[20]。易断裂的键总是与吡啶环垂直的键。酶上的离子、极性和疏水性的相互作用的综合结果决定了哪个构象占优势。例如，L-丝氨酸羟甲



过程 a：发生脱羧

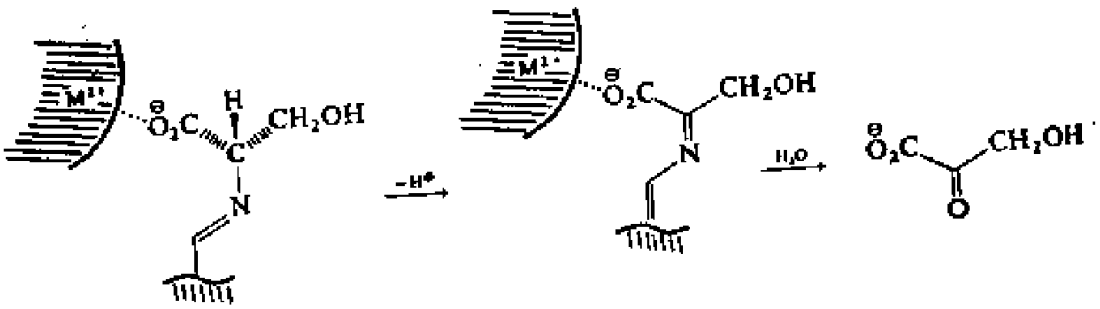
过程 b：发生氨基转移反应

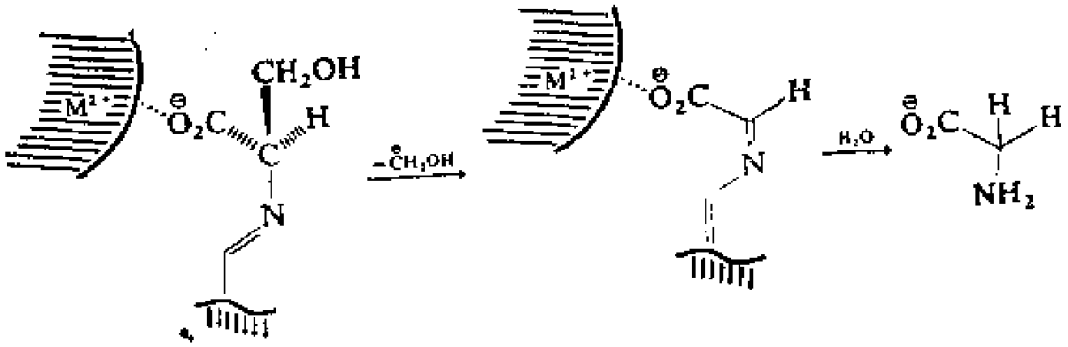
过程 c：发生羟醛缩合及其逆反应



氨基转移酶　　醛缩酶　　脱羧酶

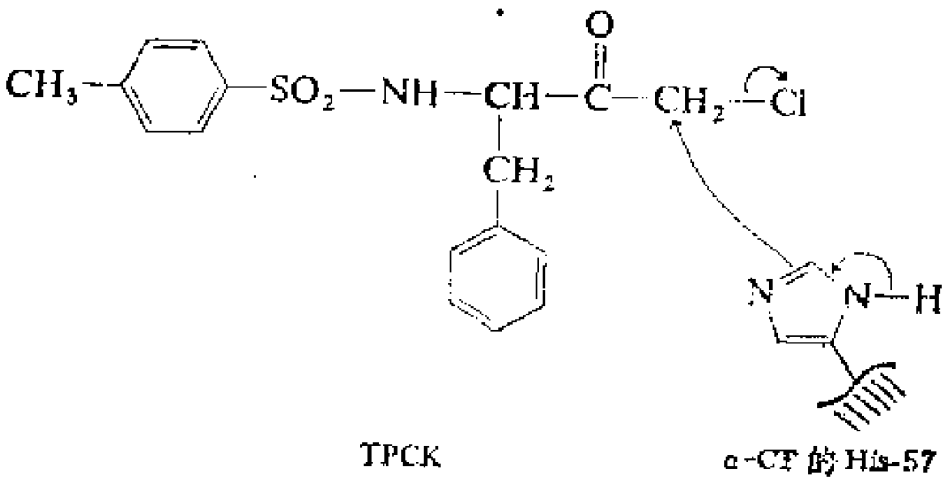
基转移酶同样能催化D-丝氨酸的氨基转移反应。在这两个反应中都依赖了吡哆醛-P的作用，但得到不同的产物。





6.4.2 自杀性酶失活剂

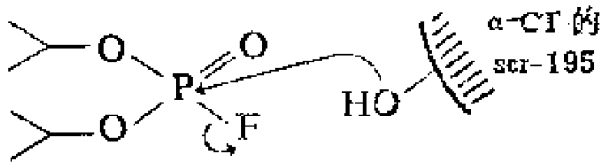
从广义上讲，当酶的活性部位受物理和（或）化学因素的封锁，但不明显改变分子的其它部分时，酶就专一性地被抑制，并由此发展了许多类型的共价抑制剂。这种工作的目的是在化学上修饰酶的活性部位的氨基酸残基，使酶失去催化活性，从而识别在催化中重要的氨基酸残基，一般的途径是合成靶酶底物的在结构上和化学上类似的活性化合物。通常其中有一个活性的亲电性取代基，可与酶上活性部位的亲核基团形成稳定的共价键。例如，由 Shaw[21] 合成的N-对甲苯磺酰基-L-苯丙氨酸氯甲基酮（TPCK）可与α-糜蛋白酶（α-CT）的His-57反应。

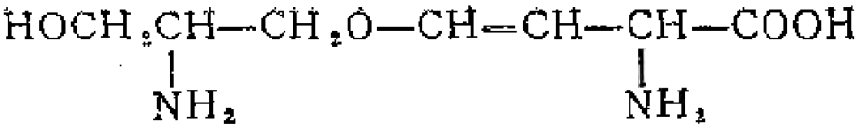


TPCK　　α-CT 的 His-57

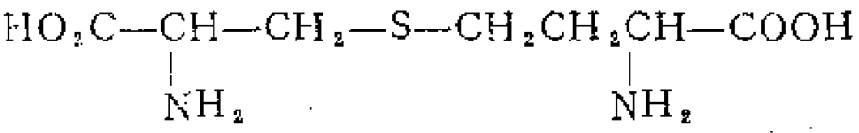
对甲苯磺酰苯丙氨酸部分模拟底物N-对甲苯磺酰-苯丙氨酸甲酯，而氯代酮是作为亲电试剂。这里的氯原子被酶的活性部位的His-57 置换。

二异丙基磷酰氟化合物同样是活性部位不可逆的抑制剂。它与丝氨酸蛋白酶类的丝氨酸残基可不可逆地结合，从而起到抑制和识别催化基团的作用。



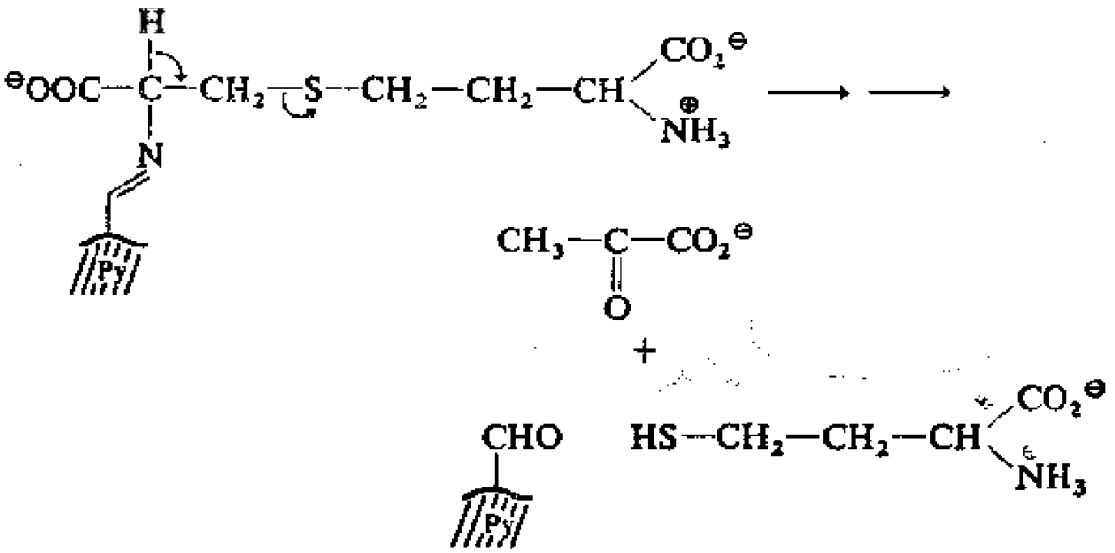


（反式）根瘤菌毒素

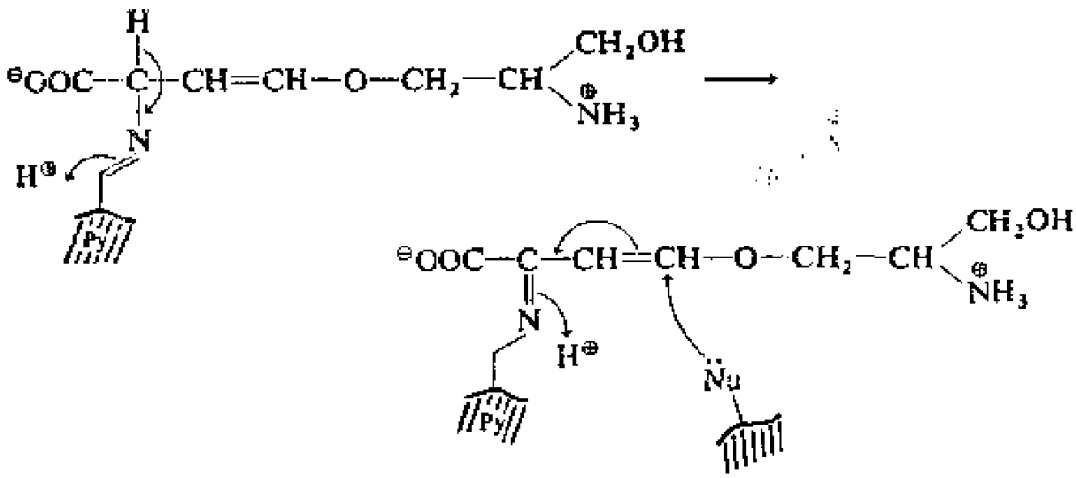


胱硫醚

β-胱硫醚酶的作用是按以下反应降解胱硫醚：



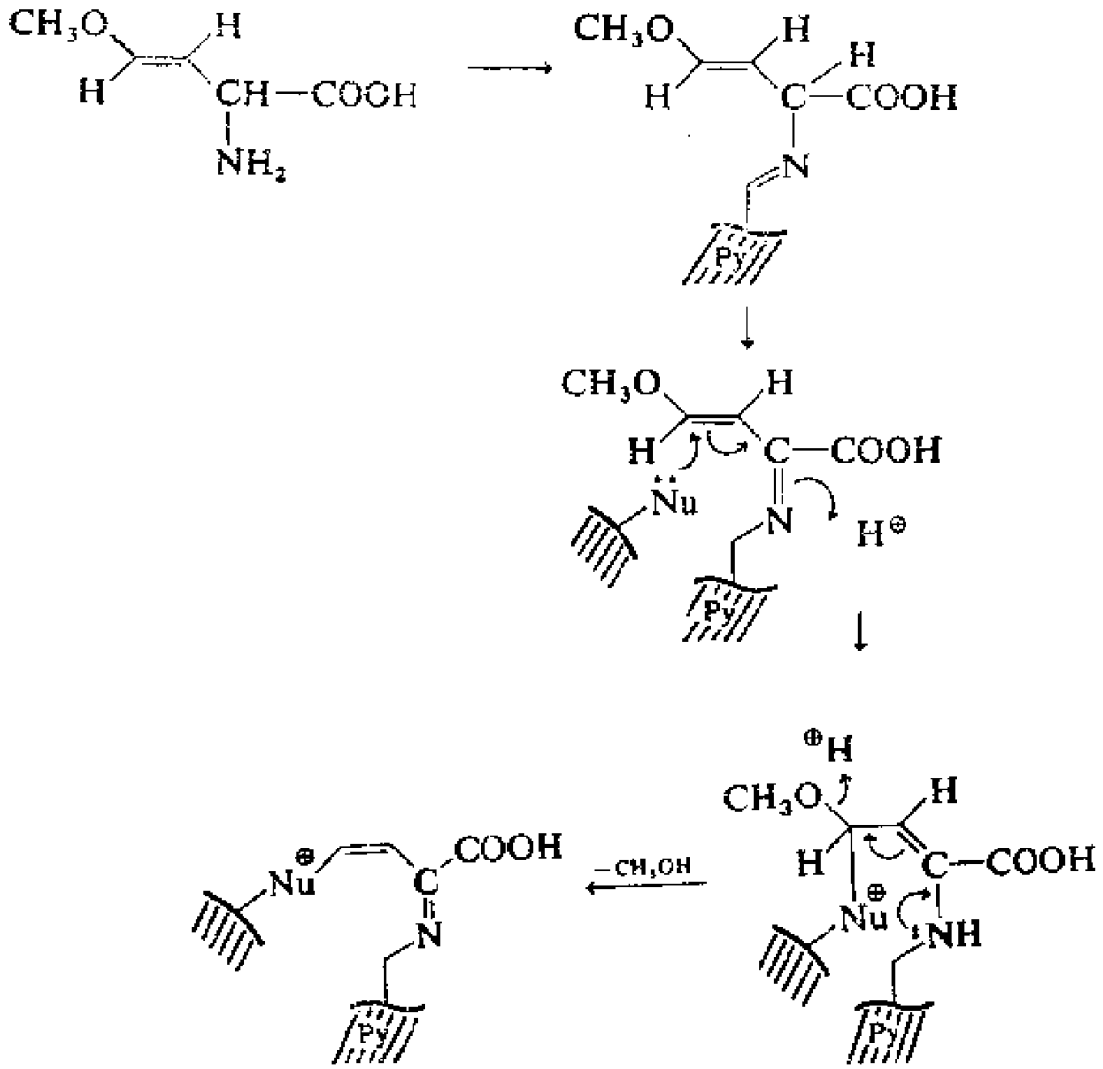
根瘤菌毒素可类似地与辅酶吡哆醛-P结合，并可形成具有共轭

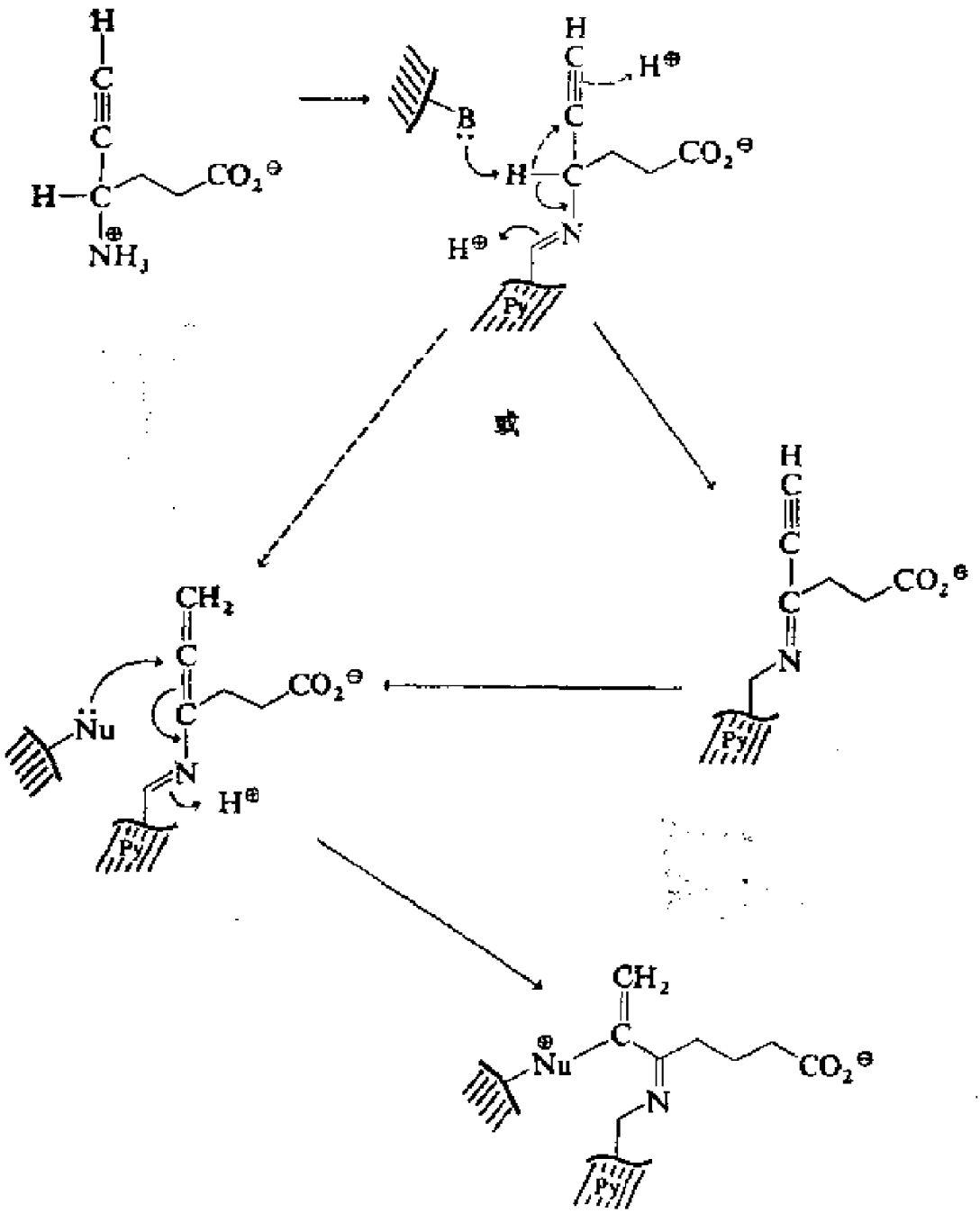


体系的分子，后者有于被酶的利蛋白上邻近亲核试剂进攻，形成新的稳定的共价键，从而不可逆地抑制了酶，阻止了体系的正常代谢功能。

由上可知，根癌菌毒素需要事先被靶酶活化之后，才能与酶上邻近的亲核试剂反应。因此，靶酶是以它特殊的作用方式催化了它自身的失活或“自杀”。

在过去30年间，酶作用的结构和机理的知识惊人地发展，因而，寻找专一性的酶抑制剂作为有效的新药已成为可能，这也导





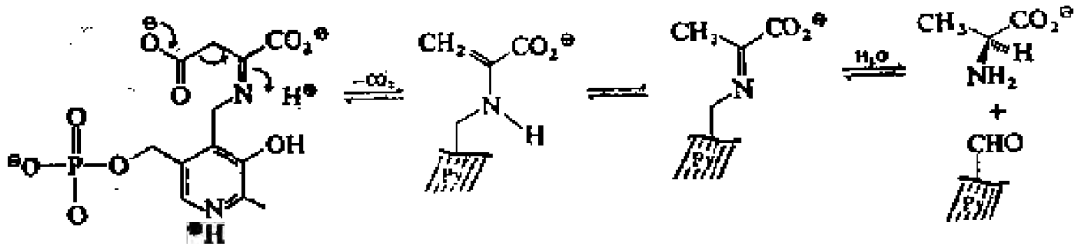
致了近年来许多吸引人的新不可逆酶抑制剂的发展。所谓“自杀性酶抑制剂”就是其中之一。很多工作是在非蛋白质水解酶上，特别是由依赖吡哆醛－P 和黄素的酶上进行的。这里介绍有关在

吡哆醛-P方面的发展。例如，以β，γ-不饱和氨基酸衍生物为潜在的抑制剂的例子[23]（见288页）。

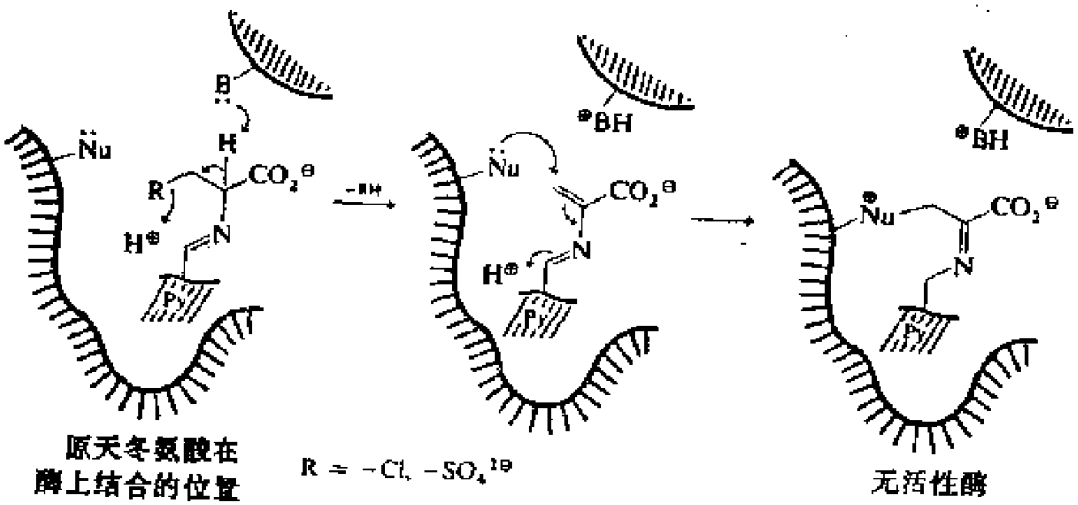
2-氨基-4-甲氧基-反式-3-丁烯酸是抑制天冬氨酸氨基转移酶的抗菌素。当其与吡哆醛-P形成具有共轭体系的分子后，酶上邻近的亲核试剂与其反应，生成共价的不可逆抑制剂。

γ-炔基氨基酸——γ-氨基丁酸（GABA）的类似物，是脑中GABA氨基转移酶的抑制剂[24]（见289页）。

在β-位有良好离去基的氨基酸衍生物也是某些酶的抑制剂。例如，在正常情况下，天冬氨酸与吡哆醛-P结合后形成的Schiff碱，经1,3-质子迁移后可脱羧生成丙氨酸：



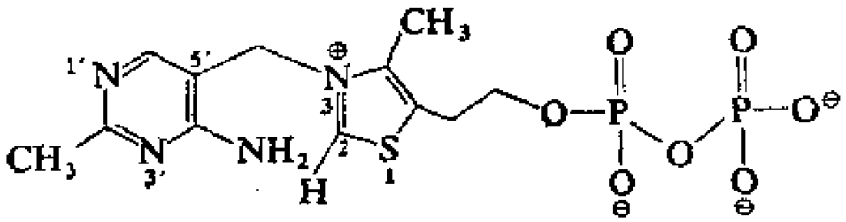
但在抑制剂存在下发生下列反应：与辅酶吡哆醛-P形成的Schiff碱在酶上碱性氨基酸残基作用下，可脱去α-氢，并随后离去Cl^-或$-SO_4^{2+}$，即发生消除反应，形成了具有共轭体系的活性分子。酶上邻近的亲核试剂可与此活性分子形成共价键，从而使酶失去了原脱羧的作用。O-硫酸酯和β-氯代丙氨酸是天冬氨酸氨基转移酶[25]和β-脱羧酶[26]的抑制剂。



上述一些例子说明了这种抑制剂对新药的设计具有重要意义，有很好的前途。因为潜在的活性基团在它接触并被靶酶活化之前，对人体是无害的，一直到被靶酶活化后，才能起抑制作用，酶是作为“自身毁灭”的特殊试剂。对于成功地设计此类抑制剂需要有三个因素：第一，酶或酶—辅酶复合物必须将化学上不活泼的分子转为活性分子；第二，活性分子与酶上活性中心的氨基酸残基之间的距离要近，便于结合成键；第三，产生的活性分子应只与活性部位的残基反应，不与其它亲核试剂反应。

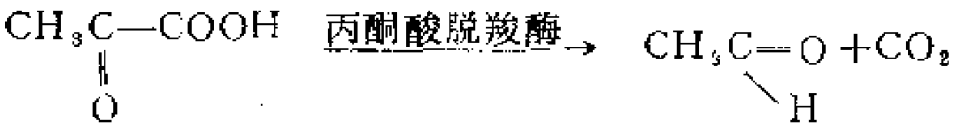
6.5 硫胺素焦磷酸酯(TPP)

硫胺素（VB_1）的焦磷酸酯（TPP）是一类重要的含硫辅酶。其结构式如下：

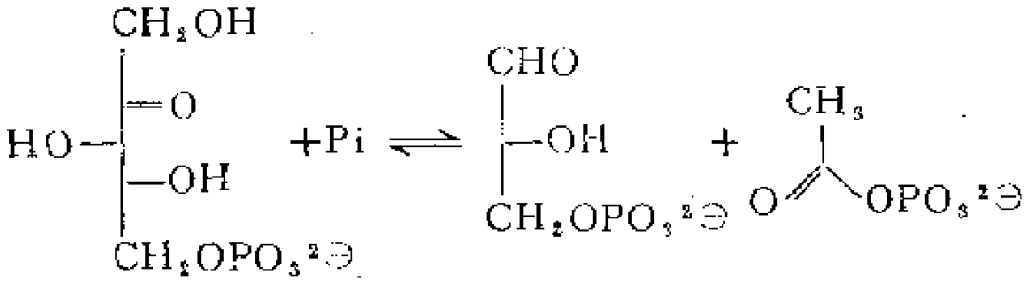


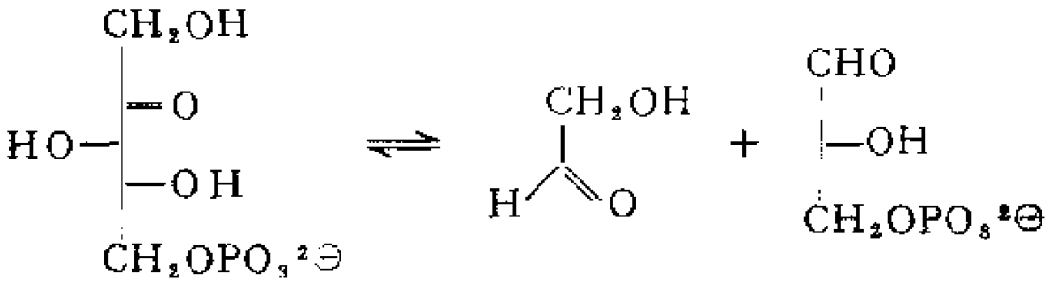
硫胺素-PP (TPP)

此辅酶参与羰基直接相邻的C—C键的生成和断裂的反应。例如α-羰基酸的非氧化和氧化的脱羧反应和醇醛缩合反应及其逆反应：

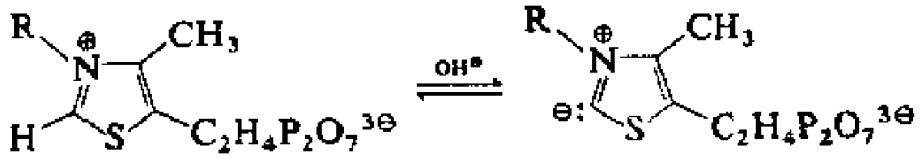


丙酮酸





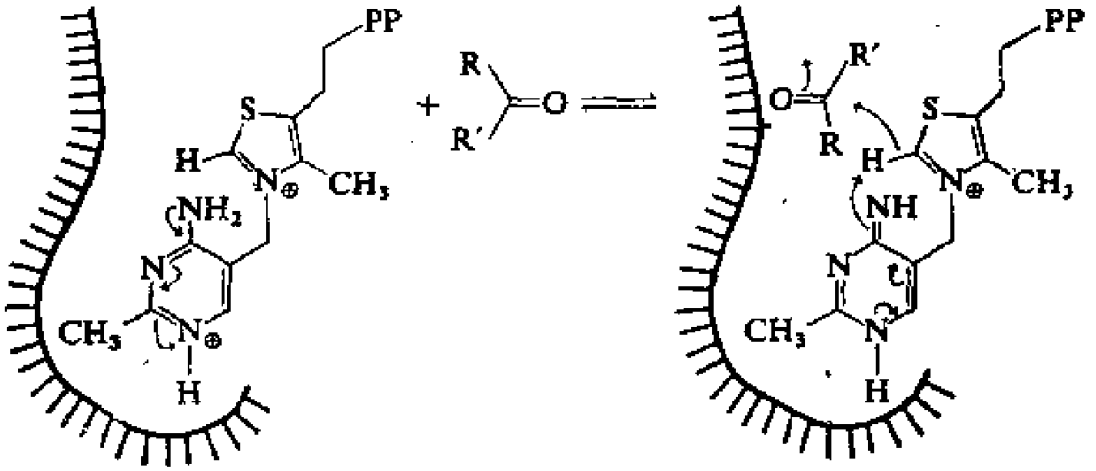
TPP的作用体现了碳负离子的化学。R.Breslow 首先从 NMR 研究了解到噻唑鎓盐离子是酸性的，在碱性重水中C-2位的氢能被氘交换[27]。



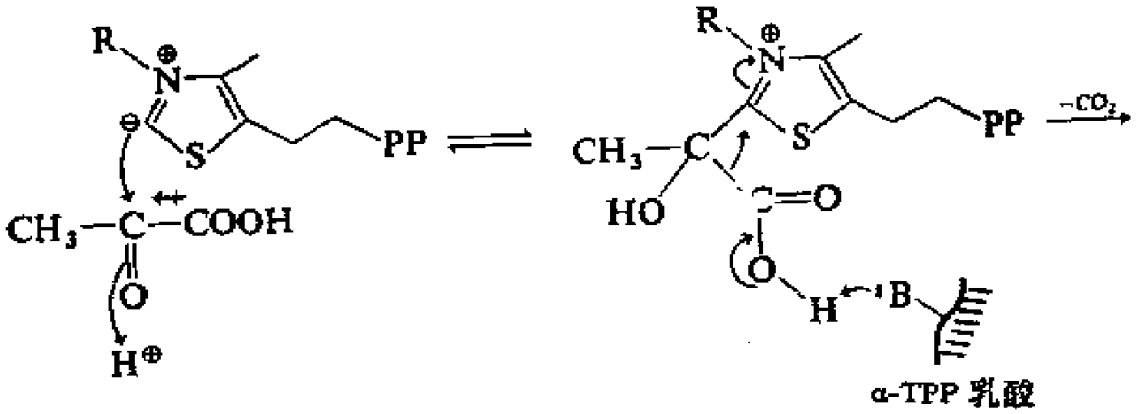
内鎓盐

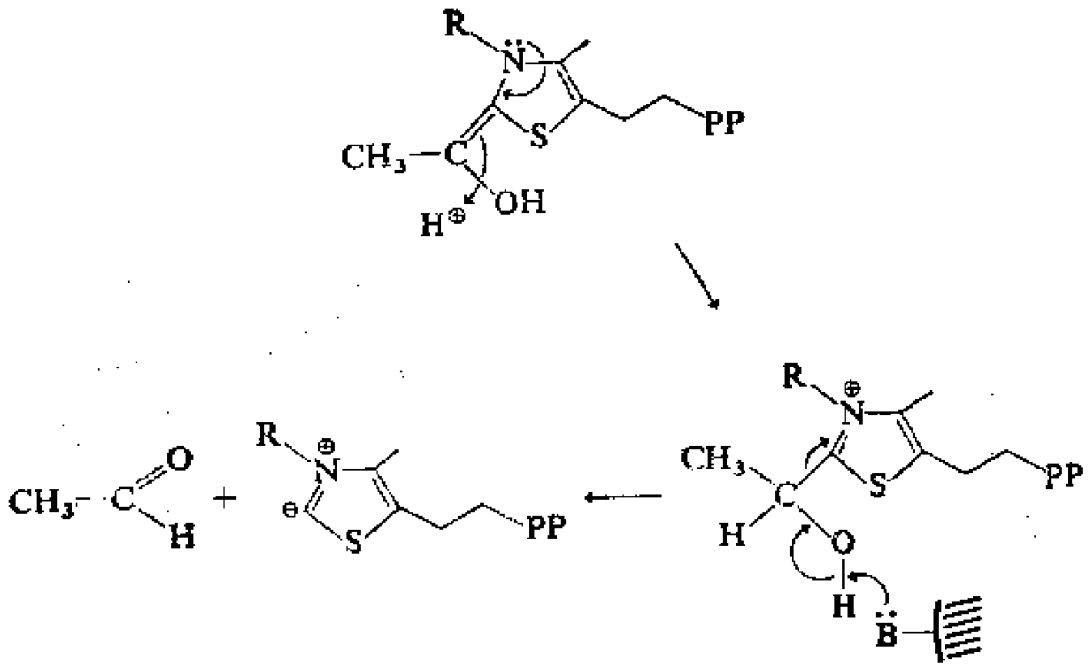
TPP中嘧啶环C-4的氨基可作为弱碱促进噻唑鎓盐的产生。例

如，Metzler[28]提出，酶可以稳定氨基嘧啶的互变异构体，然后通过嘧啶环的氨基（亚胺形式），以电荷中继方式帮助C-2位氢的除去。近年来有关硫胺素盐的 ^{13}C-NMR 工作及结晶的X-射线衍射研究都证实了这种可能性的存在。



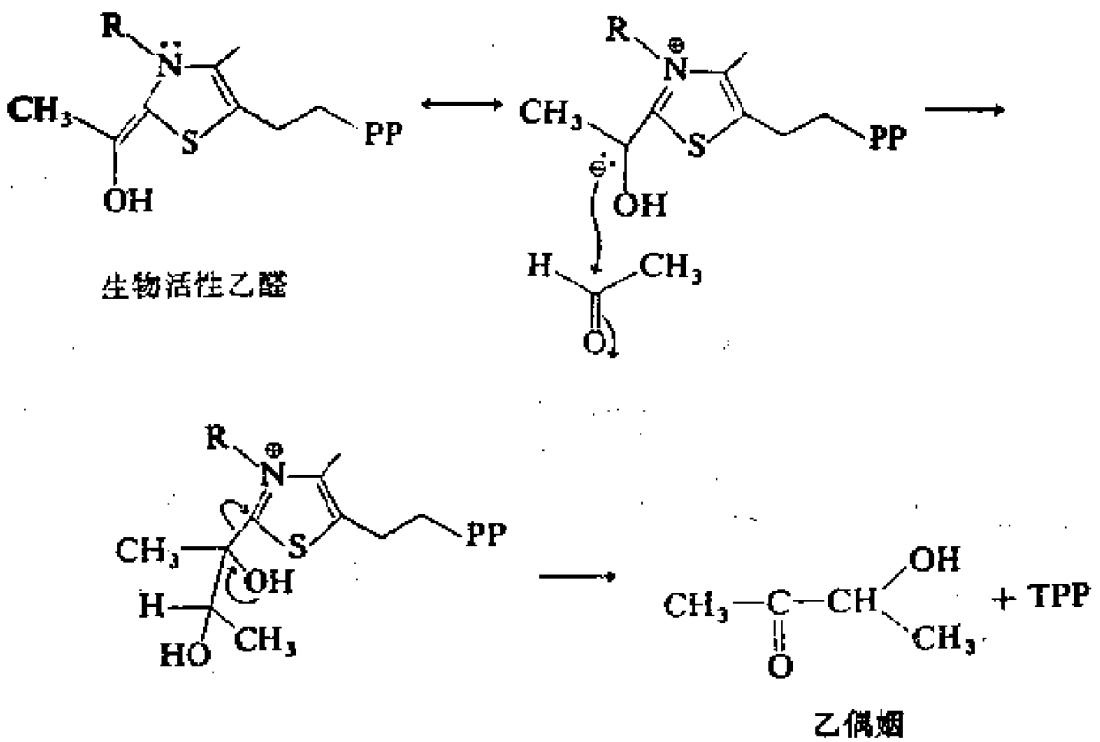
TPP化学的显著特点是噻唑鎓盐能与底物发生亲核加成，生成共价中间体。例如与丙酮酸反应时形成 α-TPP 乳酸，其脱羧生成烯醇类的化合物。此化合物的双键具有亲核能力，能与 H^+ 加成产生加成物，并最终脱去乙醛和再生TPP。在丙酮酸脱羧反应中，乙醛的释放是决定速率的一步。此外，亲核性烯醇的中间体常是TPP在体内存在的一种形式，被称为“生物活性醛”。它可





注：R代表噻啶环

与其它很多亲电性试剂发生反应。例如，与乙醛反应生成乙偶姻（acetoin）。

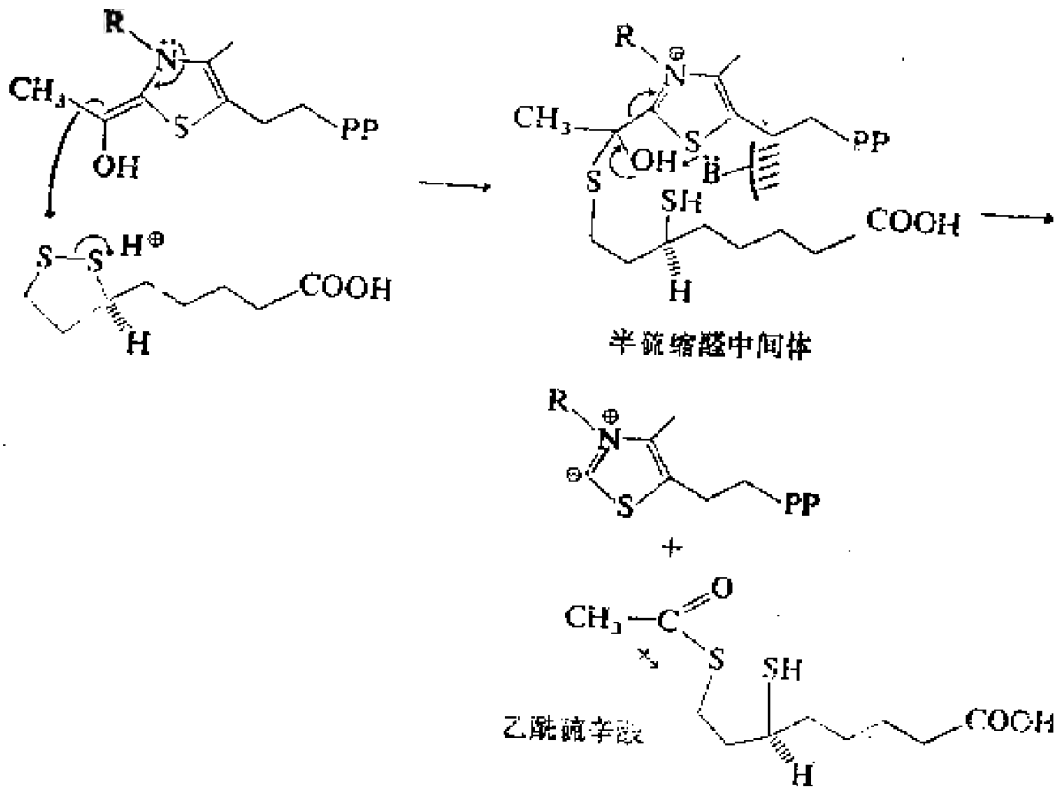


生物活性乙醛

乙偶姻

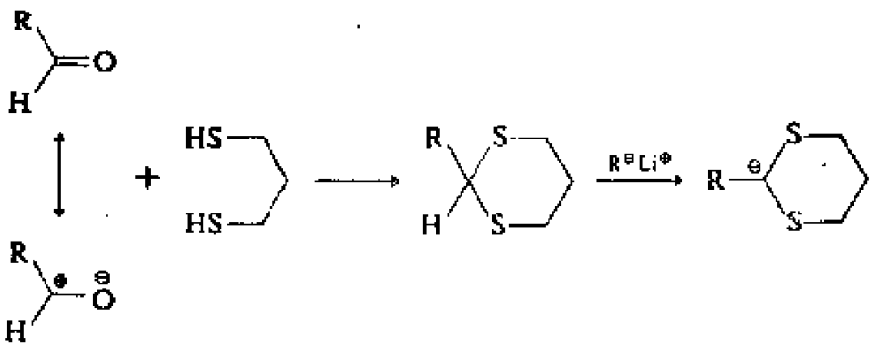
丙酮酸同样能与“生物活性醛”加成，脱羧后也可产生一分子乙联姻。不过，在酶促反应中，丙酮酸脱羧时只产生痕迹量的乙联姻。

生物活性醛与硫辛酸的反应在6.3部分已提到。在自然界中，硫辛酸与硫胺素焦磷酸酯是协同发挥作用的。这个变化相当于硫辛酸的还原酰化。



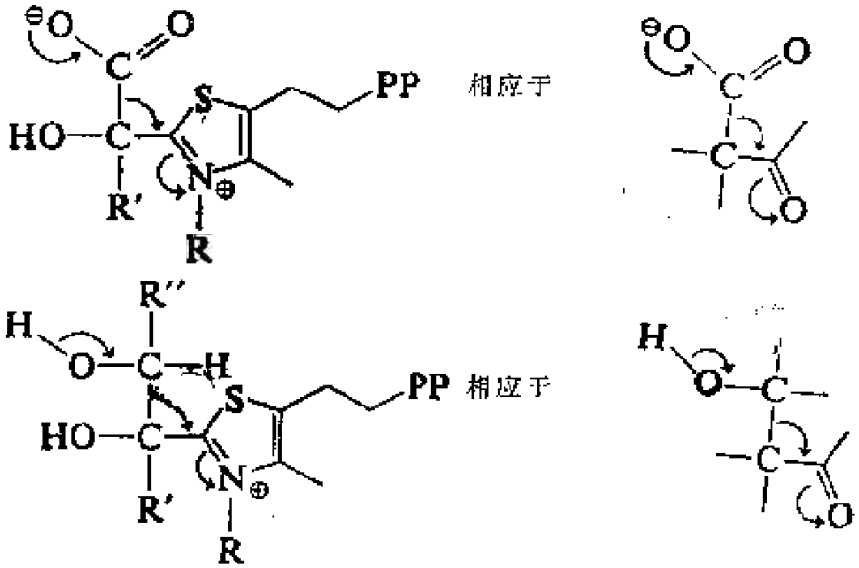
上述生物活性醛的形成及其反应体现了在有机化学中不很普遍的现象，即具有R—C(⊖)═O特征的丙酮酸转变成具有R—C(⊖)═O特征的活性醛。这种“极性翻转”的现象近年来在体外也得到了证实。例如：

由以上讨论的TPP的变化也可清楚看出其与氰根（CN^-）的类似处。而且，由于噻唑环中的氮原子已带正电荷。因此，比起



CN^-根来，TPP 产生的负电荷更为稳定。为此，TPP 也被称为生物氮化物。

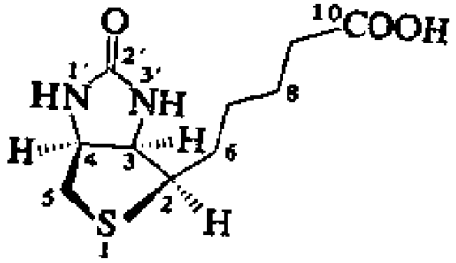
TPP 与底物形成的加成物可与β-羰基酸和β-羰基醇相比，后两者能发生β-断裂。因此，TPP具有断裂与羰基相邻的C—C键的特征：



6.6 生物素

生物素 (Biotin) 是许多酶的重要辅助因子。其中有乙酰-辅酶A羧化酶、丙酮酸羧化酶、丙酰-CoA羧化酶、尿素羧化酶、甲基丙二酰 -CoA 脱羧酶和草酰乙酸乙酯脱羧酶等。生物素可

作为“CO_2载体”。经活性的（＋）生物素的X-射线衍射结果表明生物素的两个环是顺式稠合，并且，所有三个手性碳上的氢都处于顺式的相互关系。此结构显示出五个碳的戊酸侧链会妨碍脲基部分N-3′位的反应，N-3′和C-6之间的距离仅为0.28 nm。因而，生物素发生的转移CO_2的反应是通过可逆地生成N-1′-羧基生物素达到的。生物素的硫原子能迅速氧化成亚砜或砜，后两者都有相同的生物活性。生物素的生物合成前体——脱硫生物素中不存在硫，由两个氢原子代替；在氧代生物素（Oxybiotin）中，硫被氧原子置换，但它们在很多生物体中都有相同活性；因而看来，硫原子对其生物活性不是必需的。



（＋） 生物素

目前已证明，由生物素-酶复合物催化的CO_2转移反应是以两步进行的：

$$\text{E-生物素}+\text{ATP}+HCO_3^- \overset{Mg^{++}}{\rightleftharpoons} \text{E-生物素-}CO^{2-}+\text{ADP}+\text{Pi}$$

$$\text{E-生物素-}CO_2+\text{受体} \rightleftharpoons \text{E-生物素}+\text{受体-}CO_2$$

第一步包括生成羧化生物素酶；第二步中，羧基从羧化生物素酶转移给合适的受体（底物）。生物素的功能是介导从ATP的断裂到羧基转移反应之间的过程。以上生物变化需在多酶体系中进行。其中至少包括三种不同的酶：（1）生物素载体蛋白（MW＝22,000）；生物素羧化酶（MW＝100,000）；和羧基转移酶（MW＝90,000）。每步反应都是在不同的亚基上催化发生。生物素是通过酰胺键与载体蛋白的赖氨酸残基的ε-氨基共价相连。

Moss 和 Lane 在 1971 年提出了大肠杆菌的乙酰-CoA羧化酶的模型[30]。在该模型中，生物素在催化中的主要作用是在

两个亚部位之间往返地转移固定的 CO_2 或羧基。也可以说，生物素是作为生物素羧化酶和羧基转移酶之间的 CO_2 载体（如图 6-3 所示的图解模型）。生物素羧化酶催化载体蛋白质上的生物素辅基发生羧化，然后，通过羧基转移酶，从 CO_2-生物素将羧基转移给乙酰-CoA。

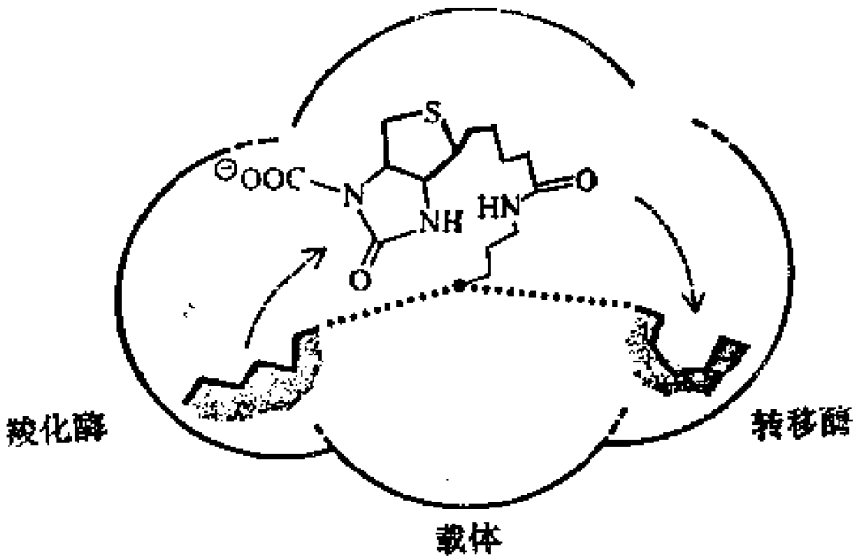
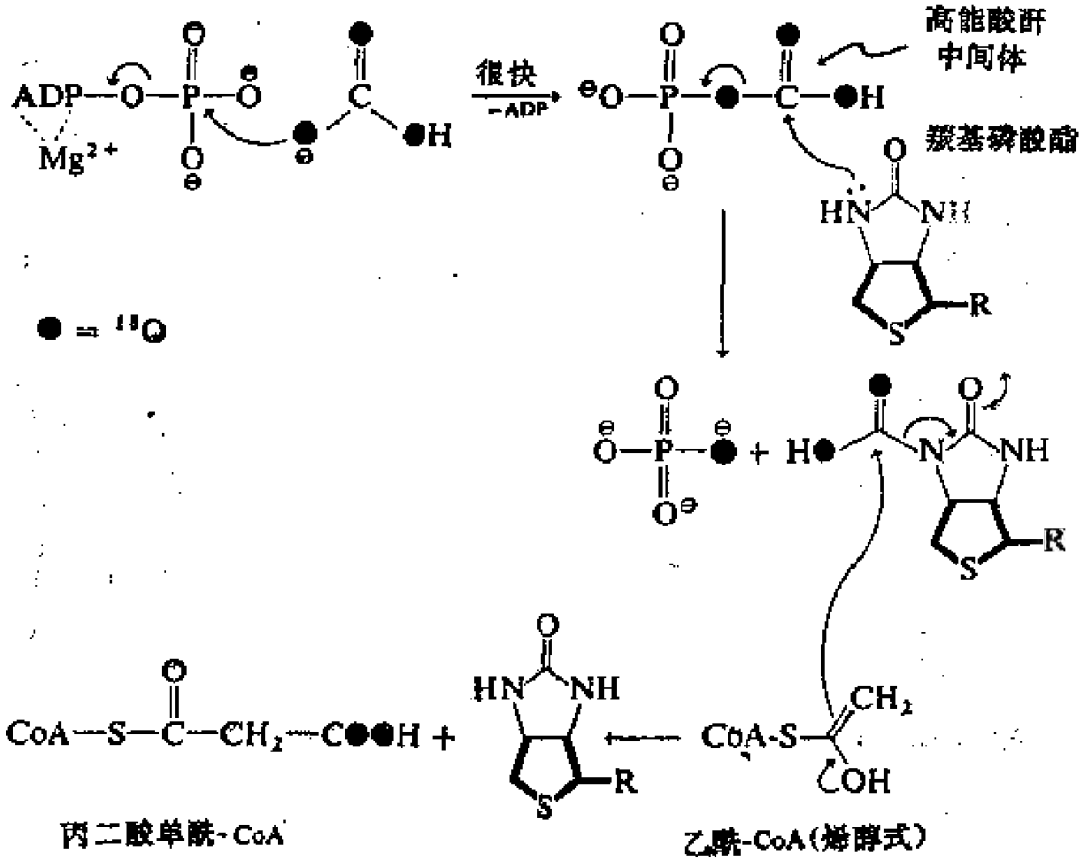


图 6-3　大肠杆菌乙酰-CoA羧化酶的图解模型

何种化学机理能解释前面提到的两个局部反应（羧化和羧基转移）呢？目前有三种看法，这三种看法都与下列实验观察是一致的，即如果用 ^{18}O 标记的碳酸氢根（$HC^{18}O_3^-$）进行反应时，两个标记的氧在最终产物中发现，而第三个标记的氧是在由ATP分解出的无机磷酸根中。

1962 年 Ochoa 首先提出了两步机理。它包括碳酸氢根被 ATP 活化，产生羰基的磷酸酯。这个活化的碳酸氢根再与结合了生物素的酶反应，给出 1′-N 羧基生物素——另一种碳酸根的活化形式。这两个过程可能以协同方式进行，并曾在一段时间内被广泛接受。1′-N-羧基生物素中间体在碱性条件下是稳定的，但在酸性条件下易脱羧。

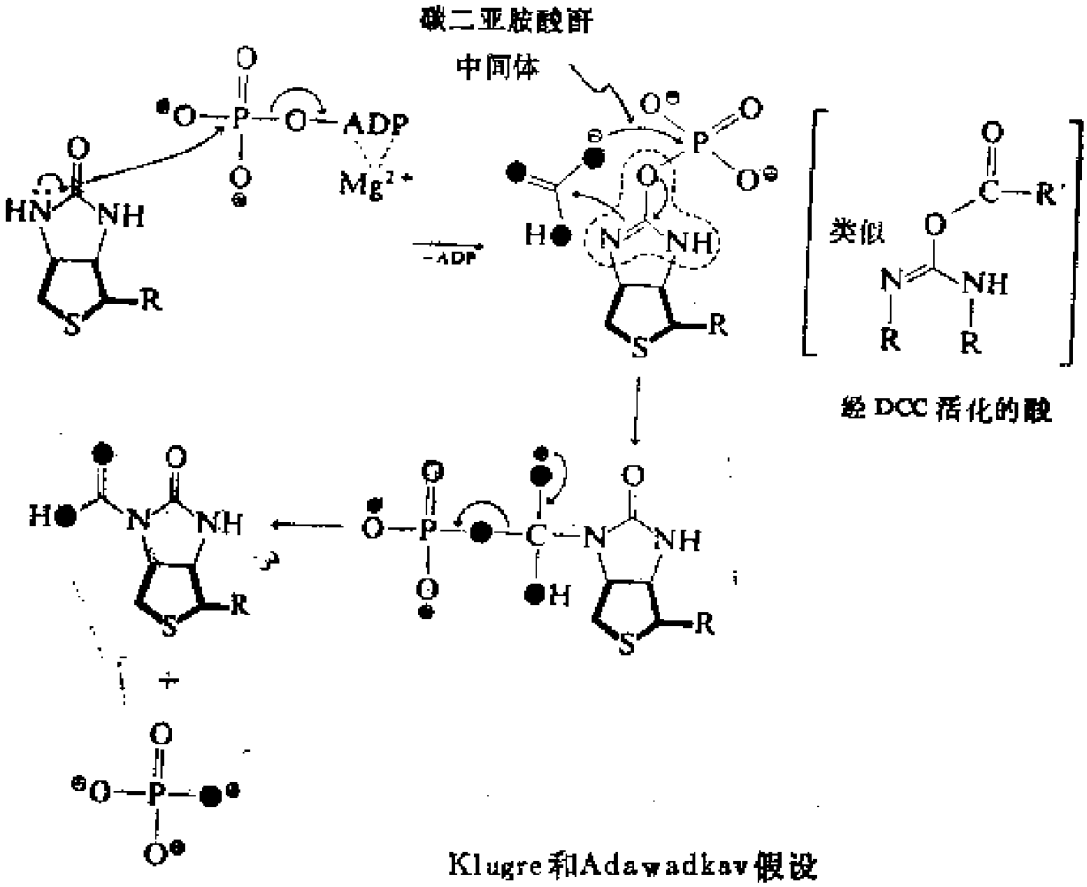


Ochoa假设

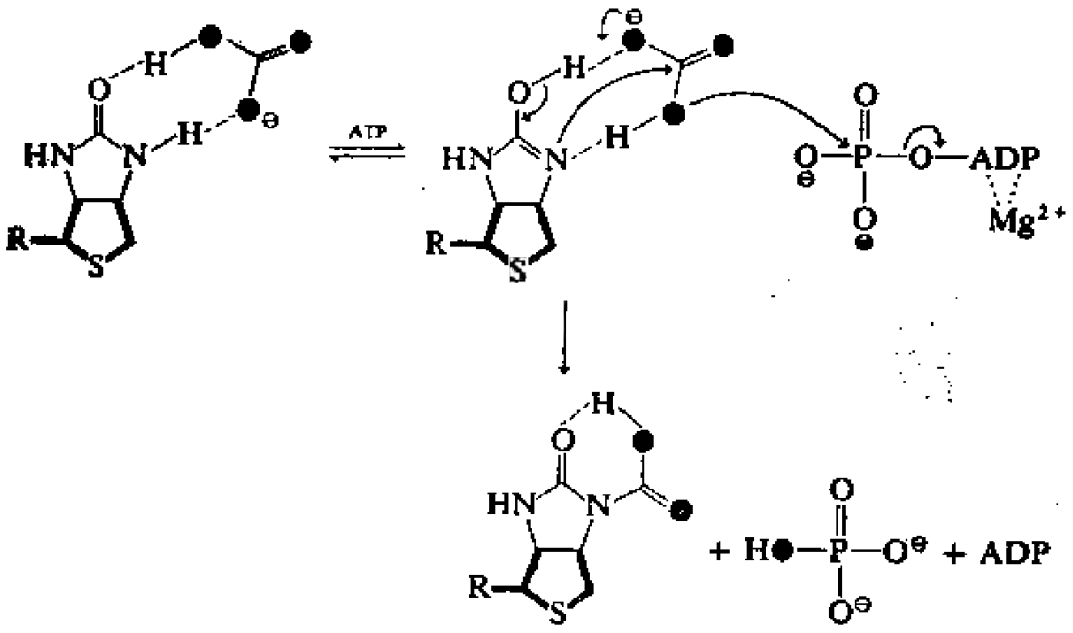
在以上例子中，羧基生物素与乙酰-CoA的烯醇形式反应，给出丙二酸单酰-CoA、并再生生物素。

1976年，Kluger和Adawadkav[31]提出了不同见解。第一步包括形成O-磷酰生物素——碳二亚胺的“隐蔽形式”O-磷酰生物素再与碳酸氢根反应，分解产生1′-N-羧基生物素和磷酸根离子。

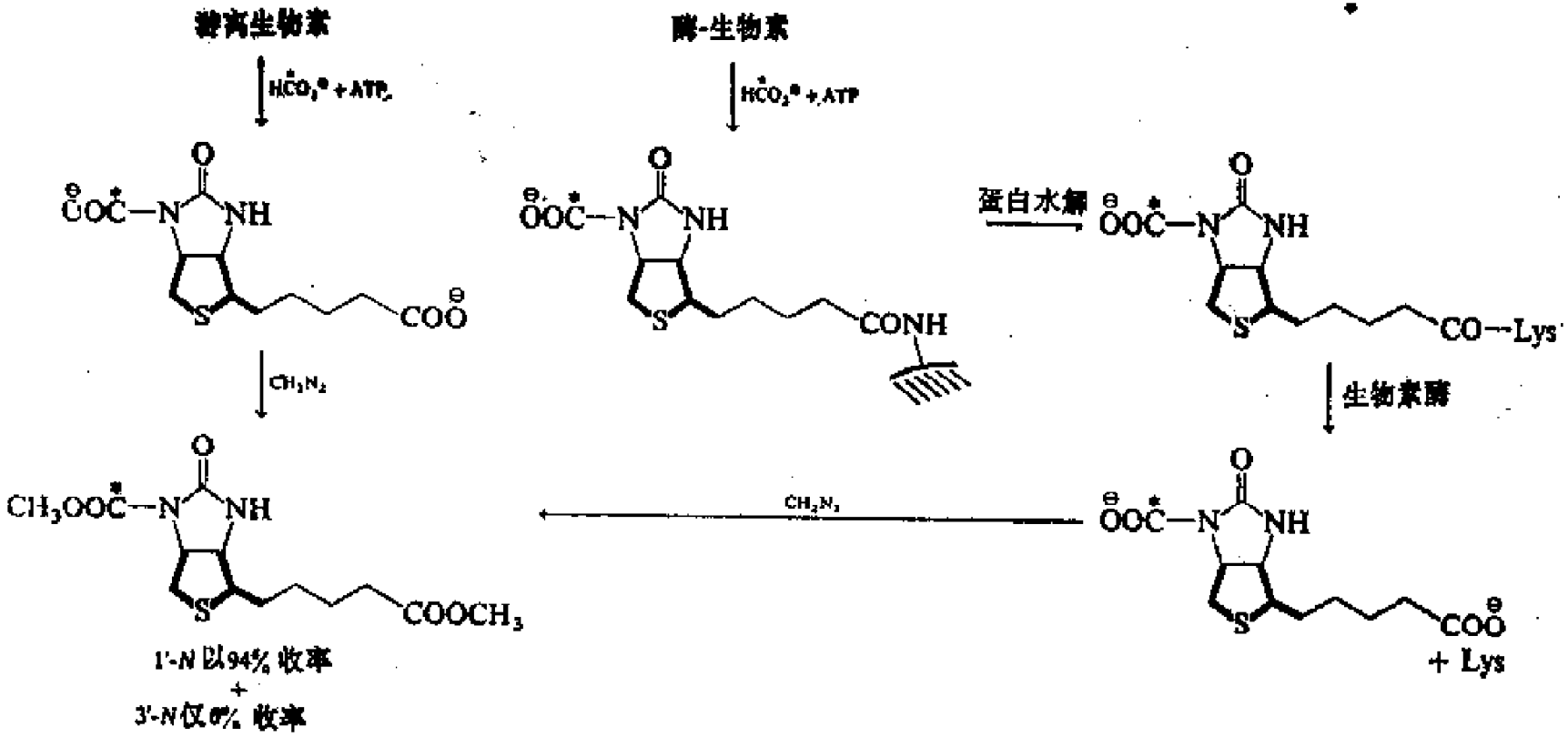
在1977年，Stalling[32]根据从生物素晶体结构中观察到的氢键分析，提出了第三种机理。他认为生物素和碳酸氢根构成了互补的氢键，以便生成“稳定的中间体”。通过ATP的键的极化和生物素脲基部分酮式-烯醇式的互变异构都增强了1′-N位的亲核性，从而引发了羧化反应。生物素以烯醇式的形式参与反应



Klugre和Adawadkav假设



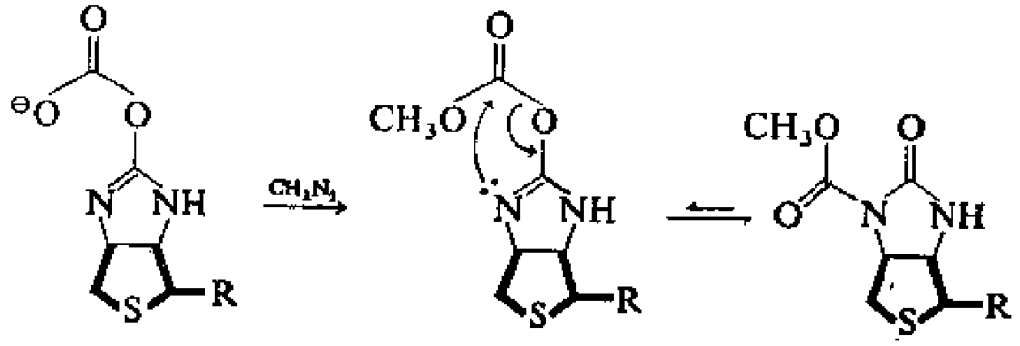
Statting假设


游离生物素
酶-生物素
蛋白水解
CO—Lys
生物素酶
+ Lys
1'-N 以94% 收率
+
3'-N 仅6% 收率

已经得到生物素结晶学研究的支持。而且，在前面提到的机理中同样出现过烯醇式中间体。ATP 的参与使平衡朝烯醇式方向移动。最后这个机理代表了被底物活化的例子。在所有三种机理中，Mg^{2+}的作用可能是结合到ATP上，促进 ADP 的形成。同时也可看到，在这三个机理中生物素的作用都被 ATP 所活化。

近年来，关于羧基连在生物素上的准确位置问题引起了不少争论。Lynen 在分离和鉴定较不稳定的（尤其在酸性 pH 中）游离的羰基生物素时发现，此化合物可经重氮甲烷转成较稳定的二甲酯[33、34]。其中，94%为1′-N-甲氧羰基-(+)-生物素，只有6%为3′-N衍生物。1′-N-甲氧羰基-(+)-生物素同样可经酶结合的生物素的酶促反应获得的产物经重氮甲烷获得。因而认为，生物素上羧化的位置是在1′-N原子上。

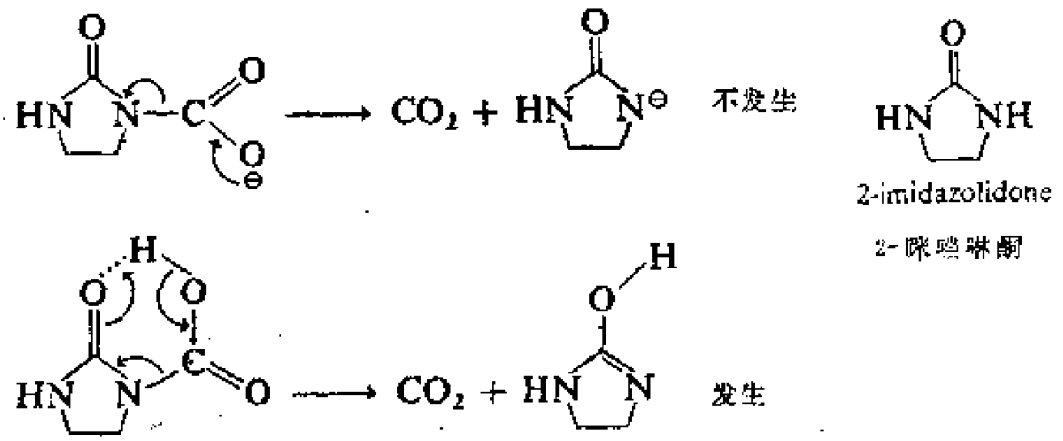
但在 1970 年，Bruice 和 Hegarty[35] 认为，羧化反应首先发生在2′-脲基-氧原子上，在分离羧基生物素的甲基化产物过程中，O-羧化的产物能通过转移羧基重排成热力学上较稳定的1′-脲基-N-取代的生物素衍生物。



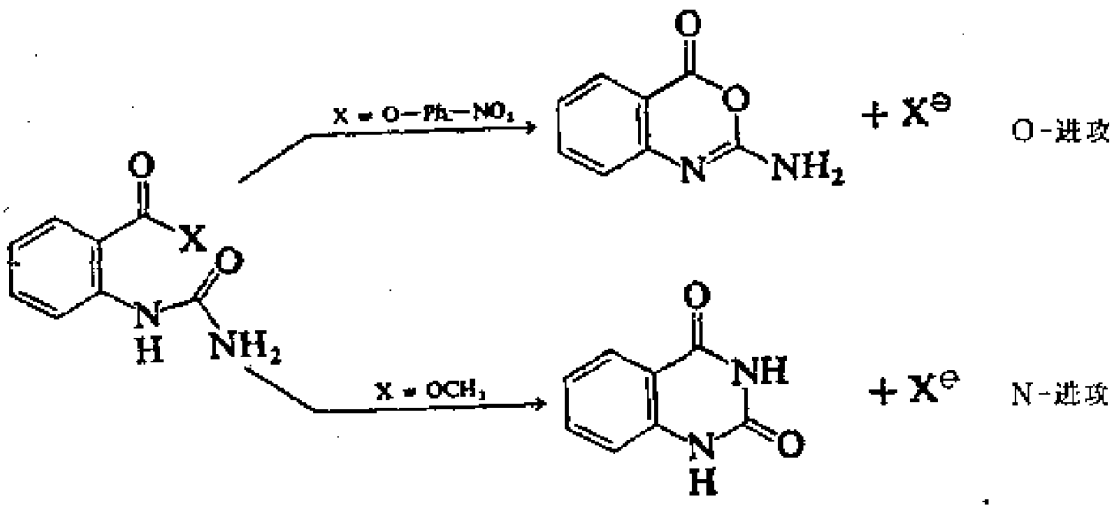
现在的问题是：最先生成什么？是1′-N羧化还是脲基氧-羧化然后迁移到氮上？为了解脲基部分在反应中的作用，显然要藉助生物有机模型。

由于生物素作为亲核催化剂参与羧化反应，Caplow 和 Yager 用2-咪唑啉酮 (imidazolidone) 作为生物素的模型化合

物进行了有关的研究。实验结果表明，当N-羧基-2-咪唑啉酮中的羧基是以羧酸根形式存在时，此化合物不发生脱羧反应，这说明咪唑啉酮负离子不是良好的离去基；但若羧基以未解离的形式存在时，化合物能以单分子方式经六元过渡态脱羧。

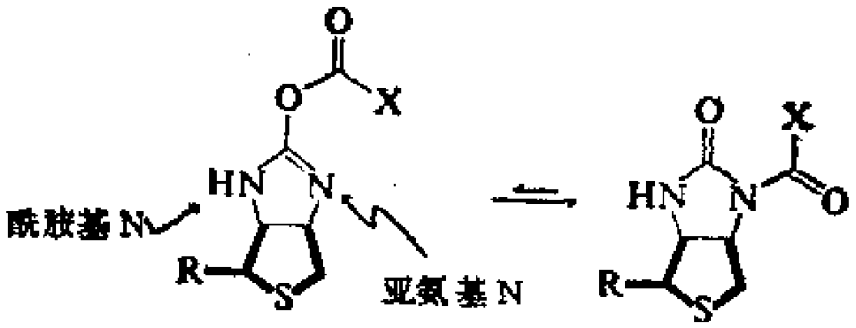


当2-咪唑啉酮用对-硝基苯氧乙酸酯、乙酰咪唑等进行酰化时，反应也不发生。这说明脲基中的氮原子不是很好的亲核试剂。但是，分子内的模型反应可能更接近于酶的反应过程。因此，Bruice 等研究了中性脲基部分对带有不同碱性的离去基的酰基底物进行分子内亲核进攻[35]。



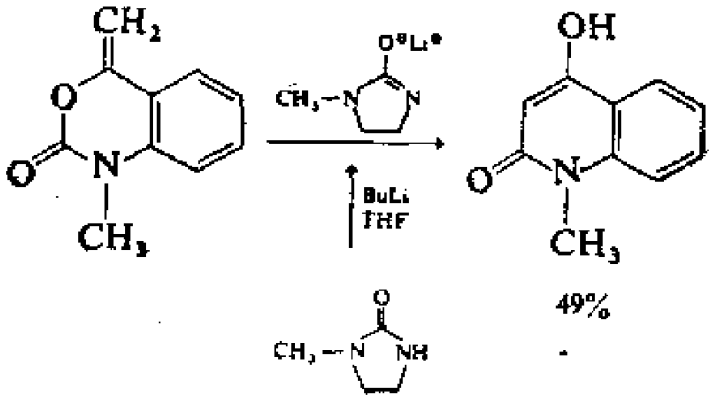
实验结果显示：若存在好的离去基团时，O-进攻优先于N-进

攻。这些结果支持了他的生物素 O-羧化的设想，首先形成高能量的O-酰基异脲类化合物，然后很快重排成较稳定的N-酰化形式。但是，由于不清楚在依赖生物素的羧化反应中，酶在稳定离去基团(X)上起多大程度的作用，所以，关于首先是发生 O-还是 N-的进攻还不能下结论。看来，简单的模型化合物不总是在酶环境中的反应性的可靠指示者。不过，已知亚氨基中的N是比酰胺中的N具有更高的亲核能力。酶结合的生物素有可能以它的高能的异脲的形式增加脲基中氮原子的亲核性。

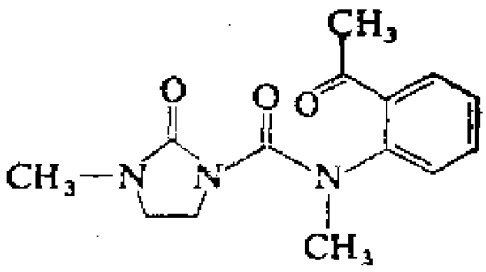


O-酰基异脲　　X＝金属-底物或结合的ATP

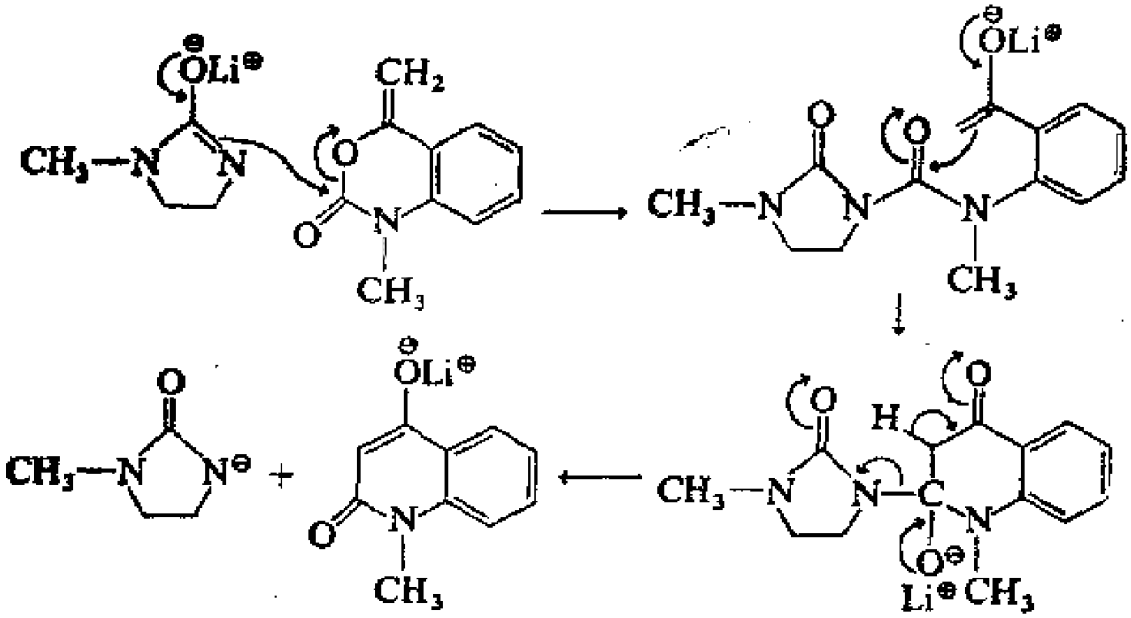
1977 年，Kellogg[36] 合成了一个有趣的模型模拟后半反应，即生物素氮原子上的羧基转移到受体分子上。实验结果显示：N-甲基-亚乙基-脲(作为生物素的异脲形式的模型) 的锂盐衍生物能使1-甲基-4-次甲基-3,1-苯并噁嗪-2-酮重排成4-羟基-1-



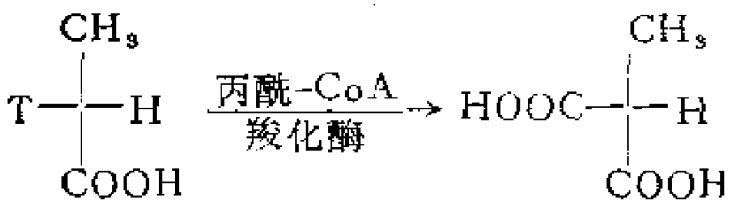
甲基-2-喹啉酮。这种重排反应在用其它有机碱如 $R_4N^+OH^-$、吡啶或 LiOH 时不发生。反应中分出 10% 收率的下列加成物：



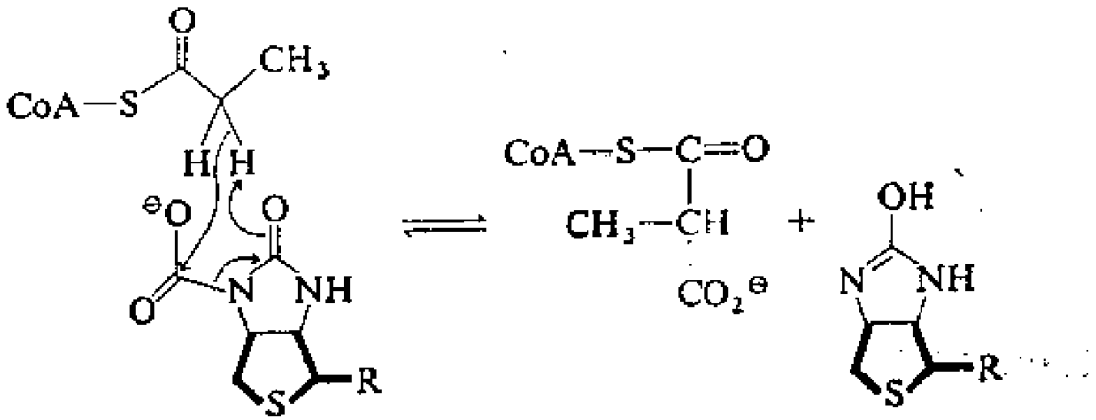
因此，下列反应机理被假设：



最后应提到转移羧基反应的立体化学问题。1966年，Arigoni 等首次用氚标记方法，提出丙酸的羧化反应是以构型保持进行[37]。类似其它依赖生物素的羧化反应，这个反应包括抽取α-质子（这里是氚）和它被CO_2的置换。



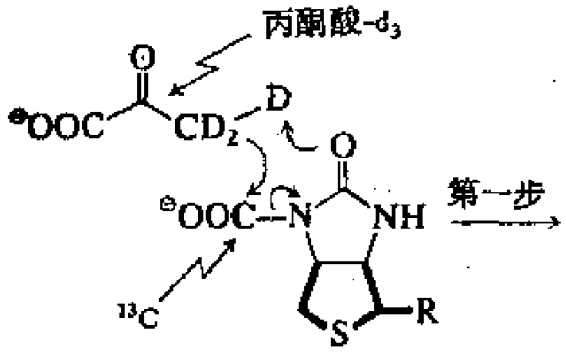
Retey和Lynen[38]和Rose等[39]认为，质子的抽取和羧化反应是协同发生的过程。

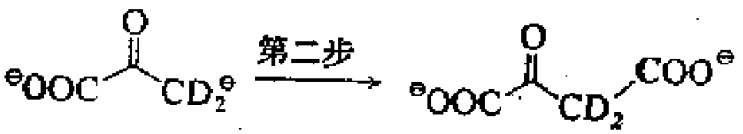


协同过程虽然能说明羧基转移反应的构型保持，但在立体化学上是不合理的。不过上述变化暗示了生物素的羰基一方面作为质子的受体；另一方面又可作为质子的供体。所以一个较好的机理必须有外部的碱，它应包括α-质子的抽取和此后羧化的多步过程。为阐明这种可能性，Stubbe 和 Abeles 在1979年观察了丙酰-CoA 羧化酶对β-氟代丙酰-CoA的作用[40]。这个底物对于决定质子抽取是否在没有羧化的情况下发生是特别合适的。因为(a)氟是小体积原子，将不会引起位阻问题；(b)当负碳离子在带氟的碳原子β-位产生时，氟化氢将被消除。氟化物的消除将说明负碳离子的形成。当β-氟丙酰-CoA在HCO_3^-、ATP和Mg(Ⅱ)存在下，与酶-生物素保温时，生成了ADP，并释放了F^-离子。F^-离子释放的速度是生成 ADP 的六倍。没有得到羧化的产物——氟甲基丙二酸单酰-CoA。F^-离子的释放表明了底物的α-质子被抽取；ADP 的生成也说明生物素-CO_2的形成。但上述的一些结果也表明了发生α-质子的抽取时，没有伴随 CO_2 从生物素-CO_2 到底物的转移。作者对此提出非协同的机理，他们认为在酶的活性部位必须有一个基团作为质子的受体。此外，在以上反应中，F^- 离子的消除比从生物素转移 CO_2 到负碳离子上来得

快。消除反应之后，复合物能通过几个可能的途径，如脱羧和释放烯丙酰-CoA，而被分解（见图 6-3）。

O′Keefe 和 Knowless′用双标记的（^{2}H和^{13}C）丙酮酸的羧化反应，对酶促生物素调节的羧基转移反应的多步机理提出了较好的证据[41]。由动力学研究得到的同位素效应和同位素分布的结果，都与在羧基转移反应中质子的除去和羧基的加入发生于不同步骤的机理相一致。





双标记的 α-羰基丁二酸

在本章结束时，再介绍一下 Visser 和 Kellogg 对于生物素其它辅和酶的起源问题的有趣推测[36]。首先，他们认为生物素在羧化反应中并没有催化能力，并不能降低反应的活化能。生物素在被活化成亲核性较强的高能互变异构体时，才能进行反应。因而看来，生物素仅作为CO_2的来回往返的载体，将两个不同的活性亚单位连接在一起。第二，生物素和硫辛酸的结构都不与核苷酸相似，但其它辅酶中至少含有一个嘌呤或嘧啶环。在关于生命起源的早期推测中，认为自身复制系统是由为核酸酶编码的类似核酸的分子组成，蛋白质在那时还不是重要的。按照他们的观点，当今的辅酶多数来自以前多核苷酸酶的遗迹，因而仍具有基

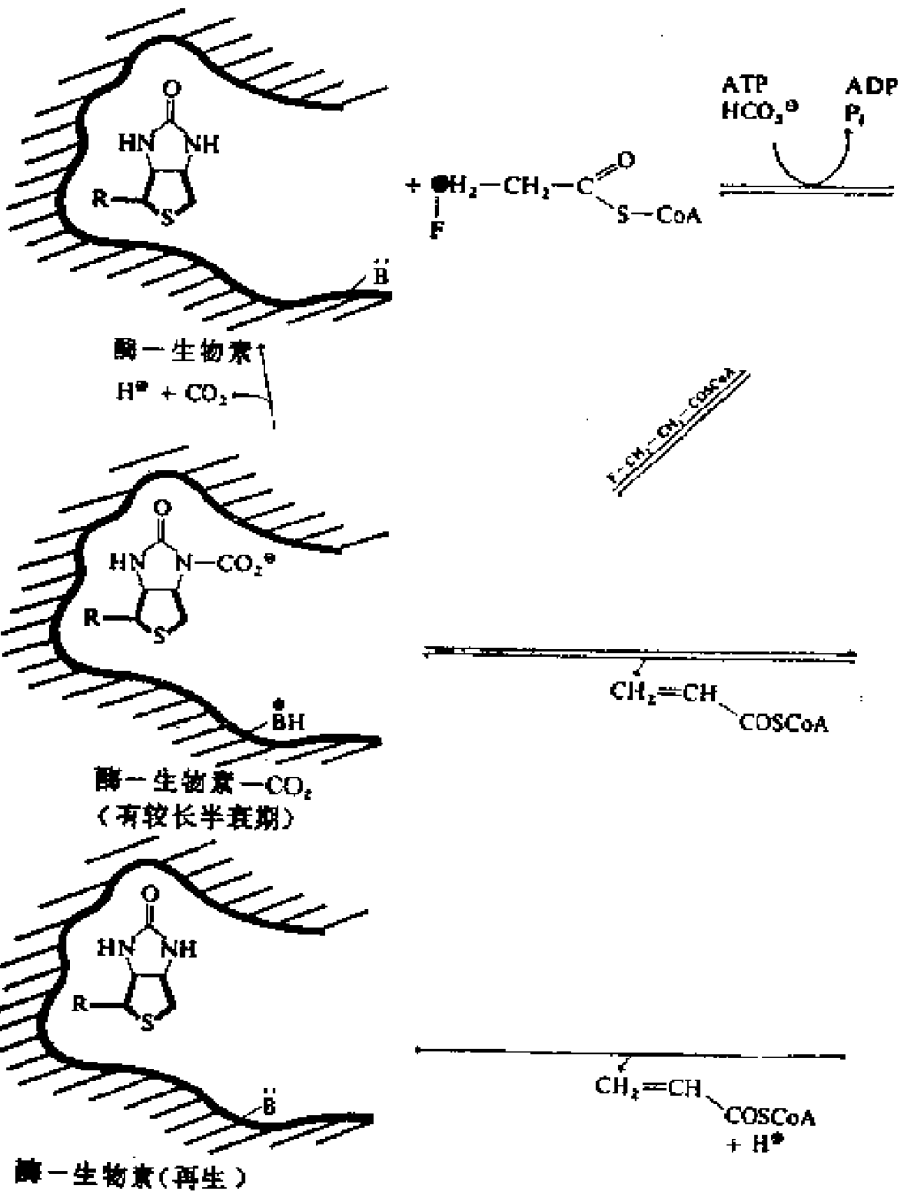
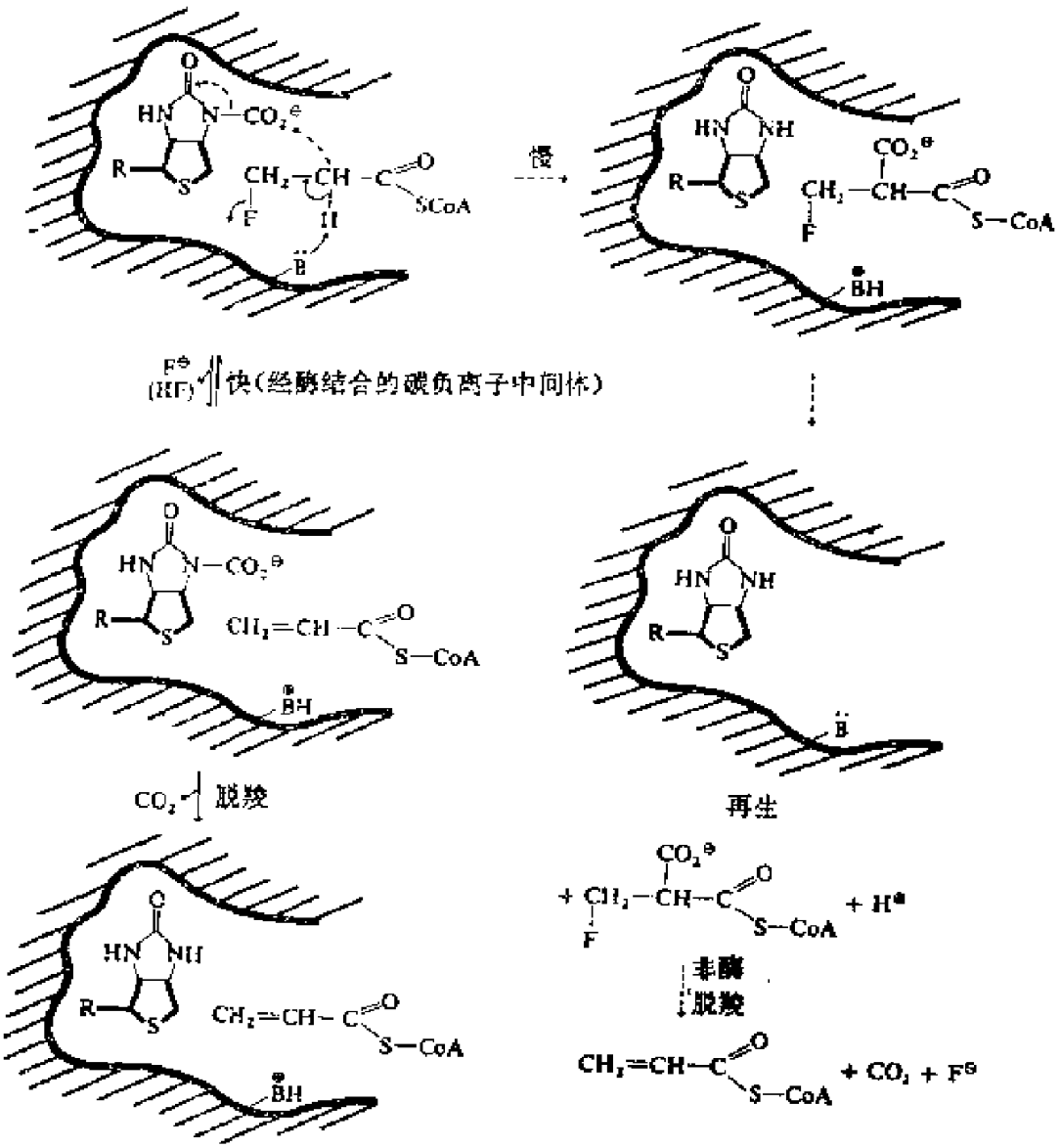


图 6-3　氟化氢从氟丙酰辅酶A中消除的机理



团转移反应的催化能力。但是生物素和硫辛酸没有作为辅酶的倾向，除非它们共价地连接到载体蛋白质中。这样，它们在多酶复合物中只是作为转移的试剂。因此，作为辅基，它们是后来进化发展而来的。

张珮瑛

第7章　金属离子

在这一章中我们将介绍一些在生物体系中，有关利用金属离子反应的基本概念。虽然N、S、O、P、C和H是组成生物体内化合物的基本元素，但是对于有机体来说，某些金属离子也是必需的。在后面我们将会看到，金属离子与生物分子之间的相互作用通常是一种配位的相互作用。这些金属离子主要是为了维持生物体的电中性。同时，在催化过程中常常也要牵涉到金属离子。因此，本章所涉及的一些论题是介于有机和无机化学原理之间的。

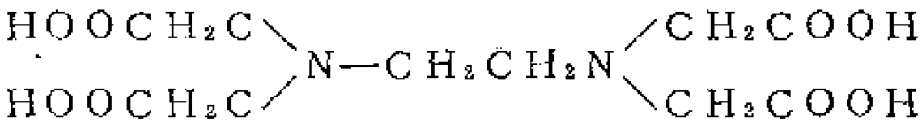
7.1　蛋白质和生物分子中的金属离子

许多金属离子对于活的细胞来讲是必需的。其中包括Na、K、Mg、Ca、Mn、Fe、Co、Cu、Mo和Zn，这些金属离子约占了人体重量的3%。Na^+、K^+、Ca^{+2}在离子泵机制中尤其重要。一些代谢物的转运和能量的产生正是在这一离子泵机制过程中进行的。许多过渡金属，比如Zn^{2+}和Co^{2+}，常存在于各种金属酶中，它们通过与氨基酸配位来增加活性部位的催化功能[1]。它们作为一种超酸（superacid）* 催化剂，起到某种定向或模板效应。而Fe^{2+}和Cu^{2+}易于结合卟啉型的辅基，在许多电子转移系统中发挥作用。

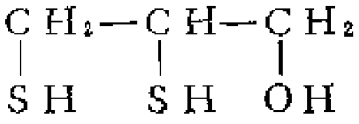
相比而言，其它金属离子，比如Hg、Cd和非金属As则是些与巯基有较强螯合作用的试剂。因而它们是有效的酶抑制剂。有毒的金属与有机毒物之间的差别在于它们不能被转化成无毒的

* 超酸（Super Acid），比100%硫酸的酸性还要强的酸叫超酸

代谢物。近三十年来，随着专一性的竞争螯合剂的发展，大大推动了对多种类型重金属中毒治疗的发展。例如，针对砷中毒的一种解毒药是2,3-二巯基-1-丙醇或BAL (British antilewisite)。它是在第二次世界大战期间，由 Rudolph Peters 研制出来的。EDTA 和它的一些类似物也是很重要的，例如可用于清除核污染受害者体内的钚。



EDTA



BAL

通过对金属离子在生物体系中作用的深入了解，我们可以预期，在不久的将来，会产生一些新的螯合剂用于治疗中，使得人体对有毒的和必需的金属有更高的、更有效的选择性[2、3]。

近年来，在探索金属酶的作用方式方面发展很快。特别是发现了反应的活性部位、在活性部位上的反应次序、以及与机理有关的一些线索。在这些过程中，重要的是羰基和磷酰基类型底物的水解（或水合）。这些底物是CO_2、羧酸酯、磷酸酯、酸酐以及肽等。这些体系在发挥作用时，相当多的需要二价金属离子，这也许是不足为奇的。然而，最令人不解的是人们发现，最常用的金属离子是Zn（Ⅱ）或Mg（Ⅱ）（例如在与 DNA、RNA、cAMP、cGMP 作用的酶中）。在哺乳动物中锌的浓度较高（2.4g/70kg 人体重量），它只略低于铁的浓度（5.4g/70kg 人体重量）．而且大部分的锌对于酶发挥正常的作用是必需的[2]。例如，Zn^{2+}可以作为胰岛素的稳定剂，这一激素使得葡萄糖易于进入细胞，Zn^{2+}又是精子的重要成分，Zn^{2+}同时还可以加速

创伤的愈合，Zn^{2+} 还参与了蛋白质类食物在肠道的消化，在视觉的一个关键反应中也有Zn^{2+}的参加。

7.2 Zn^{2+}在碳酸酐酶中的作用

碳酸酐酶是一个重要的金属酶，它催化二氧化碳转变成碳酸氢根。它是一个依赖Zn^{2+}的酶，是在将CO_2吸入血液中，然后从肺中排出的过程中所必需的一种酶。有关反应的机理可见图7-1，

$$CO_2+H_2O\rightleftharpoons HCO^-_3+H^+$$

配位的氢氧根在CO_2水合时是亲核试剂。

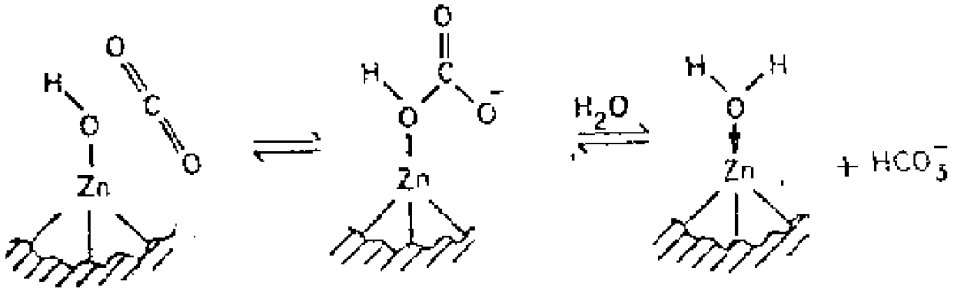
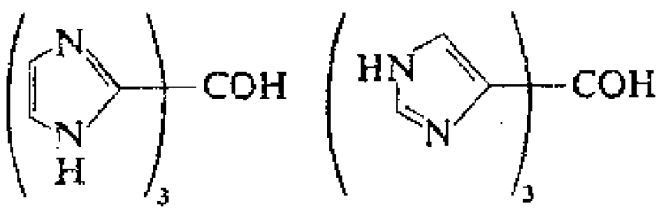


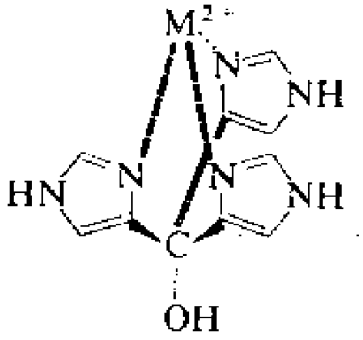
图7-1 Zn—OH对CO_2的亲核进攻

通过对碳酸酐酶进行X射线的研究表明，活性中心由三个咪唑基组成，它们与 Zn（II） 离子形成扭曲的四面体配位结构。分子模型显示，用三-（咪唑基）-甲烷衍生物也能得到相似的几何形态。由于这个原因，R. Breslow等[4]于 1978 年合成了三-〔4（5）咪唑基〕甲醇（4-TIC）和三-(2-咪唑基）甲醇（2-TIC）作为碳酸酐酶和碱性磷酸酶中结合锌的活性部位的模型。



2-TIC　　4-TIC

4-TIC是一个三叉配体，能利用三个咪唑基与Zn(Ⅱ)、Co(Ⅱ)或Ni(Ⅱ)离子配位。



4-TIC金属配位化合物（M=Zn，Co，Ni）

在碳酸酐酶存在下，四配位的Co（Ⅱ）配位化合物在非碱性水溶液中显特征蓝色，然而Co（Ⅱ）与4-TIC的配合物在非碱性溶液中却不显特征蓝色。也许是这些模型太小了，以至有利于形成八面体配合物。后来，光谱和结合部位的研究表明4-TIC的几何构型并不能很好地模拟碳酸酐酶。也许，用比4-TIC更大一些的配体能较好地模拟碳酸酐酶的光谱行为和对Zn(Ⅱ)较大的亲和力。

在利用模型化合物建立与化学方法的联系时，P. Wooley[5]曾尝试计算由合适几何构型的锌配合物所预想的活性，用来明确地说明：（1）通过固定底物的加速作用；（2）通过活化底物的加速作用；（3）通过活化辅助因子和辅基（这儿指锌离子）的加速作用。计算的结果非常接近于天然的碳酸酐酶的活性。底物CO_2的小体积和对称性提示我们，在活性部位CO_2将像水分子一样频繁地出现。

7.3 羧肽酶A与Zn^{2+}

羧肽酶A也是一个依赖于锌的酶，催化肽和蛋白质的C末端氨基酸残基或相应酯的水解。这一肽链端解酶分子量大约为34 600，而且对L-构型的芳香氨基酸有专一性。

经过Lipscomb等的努力[6]，利用X-射线的晶体衍射结构研究，羧肽酶A已成为获得较详尽结构信息的酶中的一个。羧肽酶A中仅有的一个锌离子靠近分子的中心，与His—69、Glu—72、His—196和一个水分子配位。人们对底物甘氨酰酪氨酸结合于活性部位的羧肽酶A，也进行了X射线晶体衍射研究。结合方式的主要特点是，底物C末端的羧基与Arg-145的胍盐基产生静电相互作用。底物酰胺键的羰基氧取代了水分子与Zn(Ⅱ)的配位。在底物的NH_3^+端基与Glu—245之间也存在着一个静电相互作用。此外，当加入底物以后，Tyr—248被迫从原来位置挪动1.2nm，因而将酚羟基置于将要断裂的肽键—NH—的0.3nm处，并与NH成氢键，表现出一种诱导-契合效应（inducedfit effect）（如图7-2）。但人们利用点突变（site-directed mu-

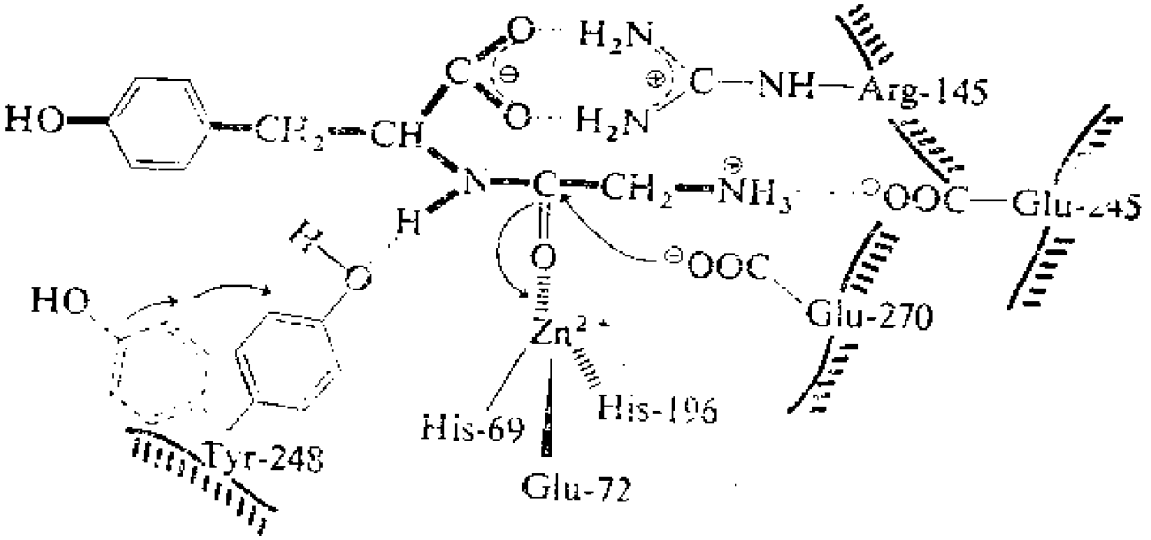
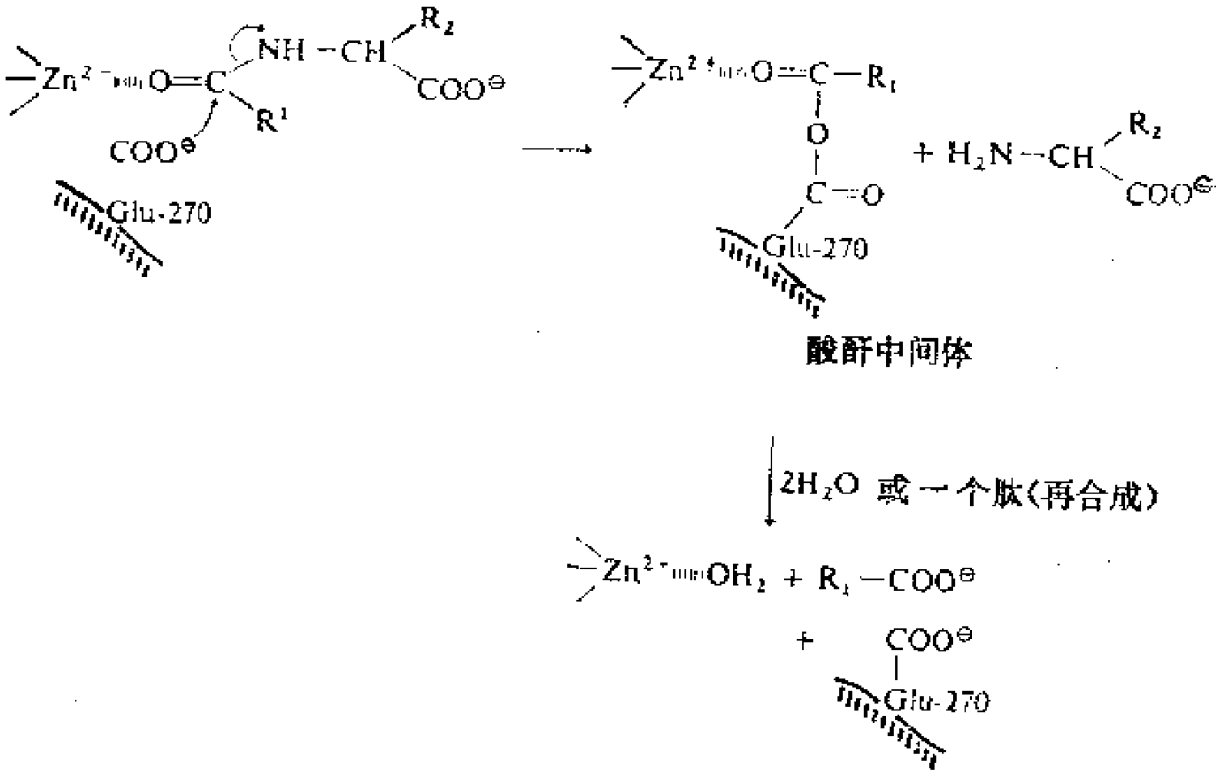


图7-2 羧肽酶A与底物的结合

tagenesis）的方法，以苯丙氨酸取代酪氨酸，酶依然保留了它催化肽及相应酯水解的能力[7]。这一实验说明，Tyr-248 似乎与催化活性并无瓜葛。最后，人们确定了Glu-270的羧酸根作为一个亲核试剂，形成酸酐中间体参与了催化过程。



上述机制涉及两步反应和一个酸酐中间体(酰化的酶)。第一步：酶的亲电性的 Zn(Ⅱ) 活化底物的羰基，以利于谷氨酸根残基的亲核性进攻，一个烷氧基（以酯为底物）或一个氨基（以肽为底物）离去，得到的产物是酶的谷氨酸残基与断裂的羰基形成的酸酐。第二步：在仅剩的催化基团 Zn(Ⅱ)催化下酸酐的水解。虽然在 $H_2{}^{18}O$ 中反应时，在谷氨酸残基的羰基上参入了 ^{18}O，但上面所提出的机制依旧是不太确定的，因为人们用羟胺这样的亲核试剂反应时，还没有发现酸酐中间体的存在。因此人们必然会怀疑这一机制的正确性。

为了解决这个问题，必须从广义上考虑到羧肽酶和金属酶作

用机制中所涉及的三个普遍的问题：

（a） 金属离子是如何影响酯和酰胺水解的？

（b） 在什么情况下，相邻的羧酸根将参与酯和酰胺的水解？这种参与的机制又是什么？

（c） 金属离子又是怎样影响分子内的羧酸根参与酯和酰胺水解的？

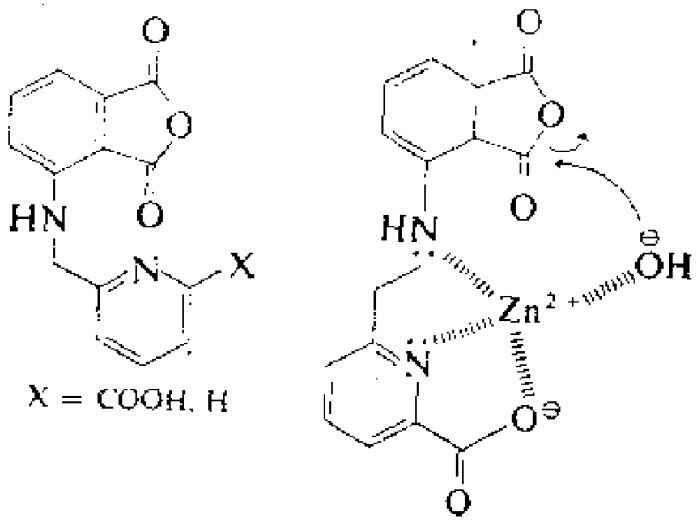
这些问题只能通过模型研究来回答。现有的许多资料可以解释问题（a）和（b），然而在尝试着回答问题（c）时，还有一些实验上的困难。因为很难找到一个系统，羧酸根有可能参与反应，而金属离子又不与之结合。

Breslow和他的小组在 1975 年和1976年，针对羧肽酶A研制了一些非常有意义而且较准确的模型[8, 9]。他们研究了在有 Zn（Ⅱ）和没有 Zn（Ⅱ）存在时，下列酸酐模型的水解情况。实验结果表明只有在 Zn（Ⅱ）存在时，这一反应才与 pH 有依赖关系，并且测出了在 pH＝7.5 时，这个假一级水解反应的速率常数（表7-1）。

表7-1 在PH＝7.5时，酸酐模型化合物的假一级水解反应速率常数

模型化合物		K观察 (s^{-1})	K*
当X＝COOH时	－Zn（Ⅱ）	2.7×10^{-3}	1.0
	＋Zn（Ⅱ）	3.0	10^3
当X＝H时	－Zn（Ⅱ）	5.5×10^{-3}	2.0
	＋Zn（Ⅱ）	1.5	5×10^3

* $K_{rel}=K_{观察+Zn(Ⅱ)} / K_{观察-Zn(Ⅱ)}$



可看，当 Zn（Ⅱ）存在时，反应速率落在羧肽酶A的范围内（0.5—230 s^{-1}），所以上面设想的机制中，酸酐的裂解一定是合理的一步。这里正如在羧肽酶A中的情况，Zn（Ⅱ）与两个氮原子和一个羧酸根配位。通过研究酸酐（X＝COOH）在羟胺作用下的开环表明，在没有 Zn(Ⅱ) 时，羟胺是进攻酸酐部分的有效的亲核试剂。然而从对pH的依赖性说明，在 Zn（Ⅱ）的催化下，亲核进攻酸酐的是 OH^- 离子而不是水分子，并且这一过程比无催化剂的羟胺进攻快得多。因此，Zn（Ⅱ）与 OH^-（来自 H_2O）的结合，使得 OH^- 成为一个非常有效的亲核试剂，以致连羟胺这样好的亲核试剂都不能与其抗衡。因此，Zn^{2+} 所起的作用是：在羧肽酶作用的第一步中，Zn^{2+} 作为一个路易士酸催化底物与 Glu—270 之间形成酸酐。同时，还通过螯合定向增加了 OH^- 的浓度，把它传递给酸酐中间体，催化了第二步反应。

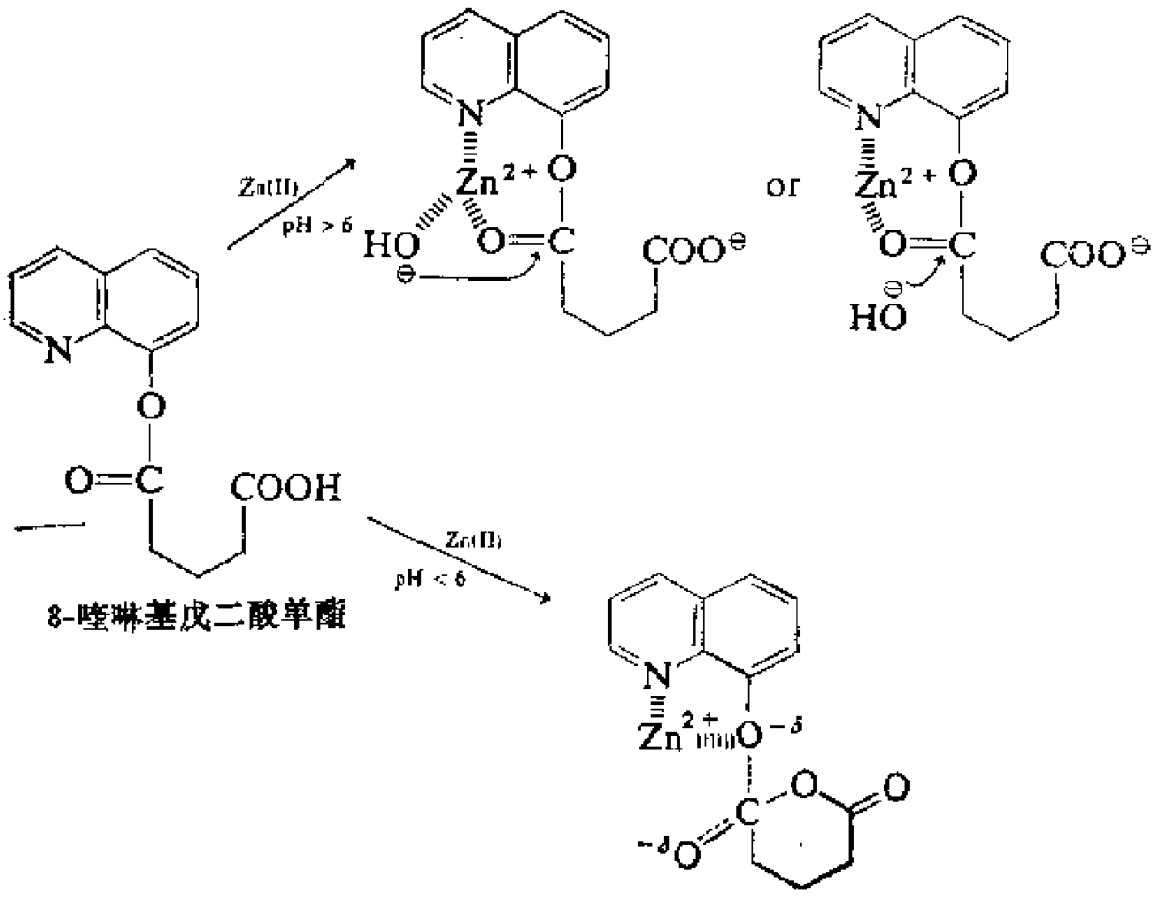
因此可以认为，金属蛋白中的锌离子和其他离子具有双重功能。首先是一种定向或模板作用，其次是在反应部位的增浓效应（即增加了反应部位亲核试剂的浓度）。

从对羧肽酶A作用方式的研究，可以归纳出以下两点：（a）Zn(Ⅱ) 离子可能与底物酯或酰胺的羰基络合，（b）Glu—270

也与之有关系。对此，人们提出了一般酸碱和亲核性两种催化机制。并且还有进一步的证据表明酯和酰胺的水解机理是不同的[10]。然而，对于羧肽酶A，有人还设想了另一种可能的机理，就是与氢氧根配位的 Zn^{2+} 对底物酯或酰胺键进行亲核性进攻。Fife 和 Squillacote[11]仔细考虑了这一机制的可能性。特别是仔细研究了在 Zn（Ⅱ）离子存在下，8-喹啉基戊二酸单酯的水解。

在 pH 6 以上，Zn（Ⅱ）离子通过与金属离子结合的氢氧根的分子内进攻，或在金属离子的促进下，通过外部 OH^- 的进攻来催化酯的水解。而当在pH 6 以下时，金属离子虽可促进 OH^- 的催化，但并不能与羧酸根的分子内进攻释放出与离子结合的8-羟基喹啉的反应相竞争[11]。

关于上述羧肽酶A的作用机理中，存在的一个问题是：Glu-



270能否作为一个亲核试剂与金属离子提供的OH^-催化剂相抗争。通过8-喹啉基戊二酸单酯的水解模型的研究似乎表明，对于以酯为底物来说，在适当的pH值条件下，两种机制都有可能存在。

关于所提出的羧肽酶A催化机理的另一争论点是：Glu-270的羧基在空间位置上能否有效地参与亲核反应。事实上，人们已利用0℃以下（−60℃）的光谱特性获得了这方面的证据，在零度以下范围内研究羧肽酶A水解专一底物O-（反式-P-氯代桂皮酰基）-L-β-苯基乳酸酯时，获得了共价结合的酰化酶中间体[12]，而且结果还表明，混和酸酐中间体的脱酰化反应是在与锌结合的羟基参与催化下进行的。

7.4 铁与氧的运输

7.4.1 运输氧的载体——携氧蛋白质

铁主要是在生物氧化还原反应中起到电子载体的作用[13]。Fe（Ⅱ）和Fe（Ⅲ）在人体内都存在，当作为电子载体时，两种氧化态循环转化。这一过程可以用细胞色素来说明。铁离子也可以转运和储存氧分子，这一作用对于所有脊椎动物来说是非常必要的。在这一系统中只有Fe（Ⅱ）存在〔Fe（Ⅲ）血红蛋白不能携带O_2〕。为了满足新陈代谢过程中对氧的需求，大多数动物产生一种可以在体内循环的体液，以便把体外的氧运送到组织的线粒体内。在那里，在呼吸链上氧化磷酸化和产生ATP时都需要氧。可是，氧在水中的溶解度太小，以致不足以提供动物呼吸所需要的氧。为了克服这一困难，几乎所有血液都含有携氧的蛋白质分子。许多动物的肌肉中也含有可逆结合氧的蛋白质。这些蛋白质便于通过肌肉吸收氧分子，也可以作为一个氧分子的储备库。

携氧蛋白质的分子结构是非常令人惊叹的。在自然界的生物

进化过程中，已经演化出几种蛋白质分子以携带氧分子。每一种都有迷人的色彩。这些蛋白质可分成三大类：血红蛋白（hemoglobin），在人体和许多其他动物血液中的一类红色物质；血蓝蛋白（hemocyanin），在许多软体动物和节肢动物血液中含有的蓝色物质；蚯蚓血红蛋白（hemerythrin），一种在少数无脊椎动物体液内的呈红葡萄酒色的蛋白质。所有这些蛋白质均为金属蛋白。血红蛋白经由亚铁血红素而包含铁，血蓝蛋白有一个铜簇二聚体，蚯蚓血红蛋白有一个以铁为中心的二聚体。

7.4.2 血红蛋白的结构与功能

血红蛋白是血红细胞中的一种红色蛋白质，它将氧从肺带到组织，它包含了体内大约3/4的铁。血红蛋白是一个四聚体分子，由两个相似但长度不等的珠蛋白（多肽链）组成。在蛋白质的中心，有一个含卟啉核的辅基。它作为铁离子四配位配体。这个卟啉—铁络合物称为亚铁血红素。与血红素结合的蛋白质分子就是血红素蛋白（hemoprotein）。

普遍存在于动植物细胞内的血红素蛋白，至少起到四种与氧和产生能量有关的重要作用：（1）把氧运送到组织中；（2）催化有机物的氧化；（3）分解过氧化物；（4）传递电子。血红蛋白可逆地与氧结合，所以当氧的分压较高时，比如说在肺部，氧优先与蛋白质结合。相反地，在需要氧的组织里，氧合血红蛋白配合物会发生离解。接着氧就转移给另一个结合氧的血红素蛋白——肌红蛋白（myoglobin）。这样，肌红蛋白就把氧从血液传递给肌细胞，在肌细胞中储备的氧可以作为一种能量的来源。

目前，在自然界中只有铁卟啉蛋白、铁蛋白和铜蛋白具有这种可逆地与氧结合的能力。而且，其他小分子如CO、CO_2或CN^-也能与这些金属蛋白结合。事实上，CO与血红蛋白的结合能力甚至大大超过氧，致使细胞内缺氧，这种情况有时叫做“一氧化

碳中毒”。

在血红蛋白和肌红蛋白这两种蛋白质中，血红素都是通过80个疏水性的相互作用，一个配位键(组氨酸的咪唑环与铁原子之间形成的)与蛋白质部分紧紧结合。尽管所有血红蛋白和肌红蛋白的氨基酸序列存在着许许多多的差别，但是肌红蛋白-和血红蛋白-血红素单位却有非常相似的四级结构：都是由八个螺旋区组成。血红素楔在两个螺旋区的裂隙间，氧原子结合在卟啉环的一侧，组氨酸残基在另一侧与之配位结合。人们相信，血红蛋白这种独特地结合氧的能力依赖于血红蛋白和肌红蛋白的整个分子的结构特征。

在脱氧血红蛋白中，铁原子以高自旋态的 Fe（Ⅱ）略偏于卟啉环平面之外。但当结合氧以后，就变成低自旋态的Fe(Ⅱ)，同时移入卟啉环面内。很显然，这就导致了邻近的咪唑环移动0.06nm，从而造成整个蛋白质骨架构象的改变，产生了高氧亲和力的蛋白质的四级结构。这一结构变化是 Perutz 用来解释血红蛋白内“协同性”的分子模型的基础。的确，血红蛋白最重要的性质是与氧结合的协同性。也就是说，四聚体亲和氧的能力随着饱和度*的增加而增加。由Morod等提出的“变构(allostery)”概念，最初就是根据这种蛋白质而提出来的。氧从载体血红蛋白传递给受体肌红蛋白需要这种协同性，同时也适合于其他生理需要。

最后要提醒大家注意的是，与卟啉结合的铁是以亚铁形式存在的。血红蛋白的铁原子显示出以 1：1 的化学计量关系可逆地结合氧，而不会使 Fe（Ⅱ）氧化成 Fe（Ⅲ）。科学家们正在寻找研究血红素中的Fe(Ⅱ)这种可逆地结合氧的方法。事实上，当血红素被结合至一个大的蛋白质结构中时，它就具有可逆结合氧的能力。但是血红素从任何蛋白质中移出，放入室温的溶液中

* 血红蛋白有四个亚基，每个亚基都可以结合一个氧分子，四个亚基结合四个氧分子后，就称它饱和了。

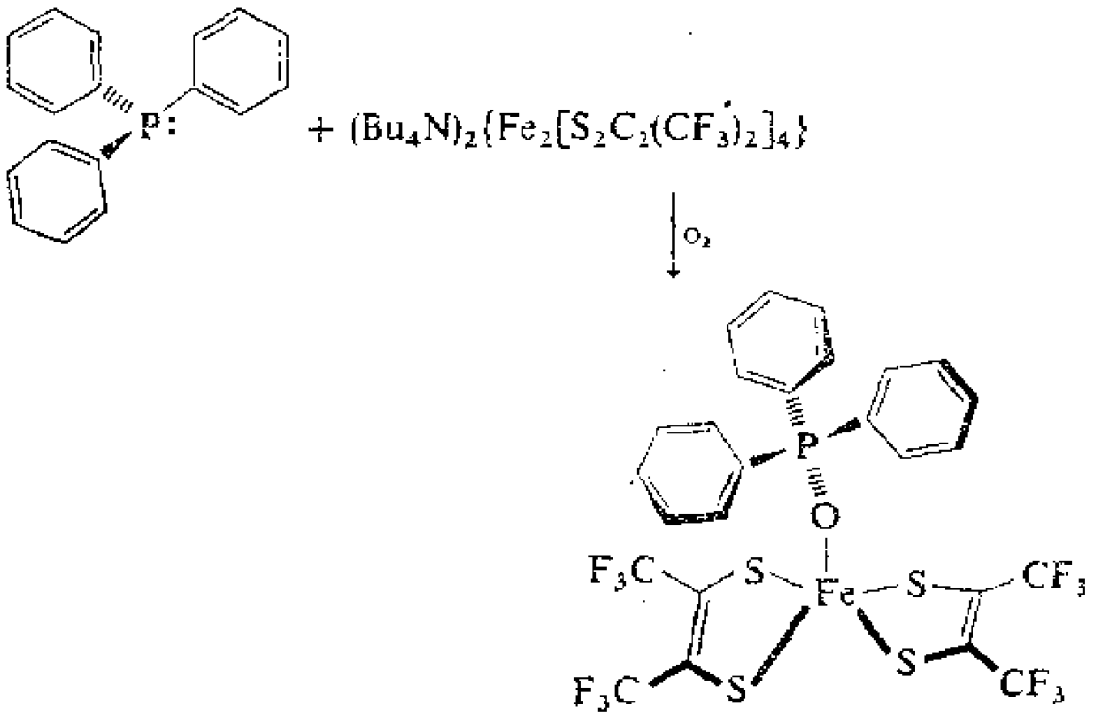
时，氧分子就不可逆地将铁氧化成高铁的形式。

其实，在中性pH时，Fe^{3+} 易于水解成通常所说的锈，即不溶的四氧化三铁。当然，在自然界中，必须避免在卟啉中生成“锈”或不可溶的氧化物。因此，大的卟啉环配体不得不被一个由血红蛋白和肌红蛋白的多肽链形成的疏水袋所包裹起来。

7.4.3 携氧蛋白质调节氧亲和性的模型

人们已进行了许多模型的研究，以尝试着解释血红蛋白和肌红蛋白调节对氧亲和力的方法[17]。制造血红素模型化合物的目的是为了回答以下问题：（1）在用物理方法，如X射线晶体衍射，测量血红蛋白时，如何防止Fe(Ⅱ)氧化成Fe（Ⅲ）？（2）血红素、血红素-CO和血红素-O_2配位化合物的详细分子几何构型如何？（3）在血红素蛋白中如何控制对氧的亲和力和氧化速度？

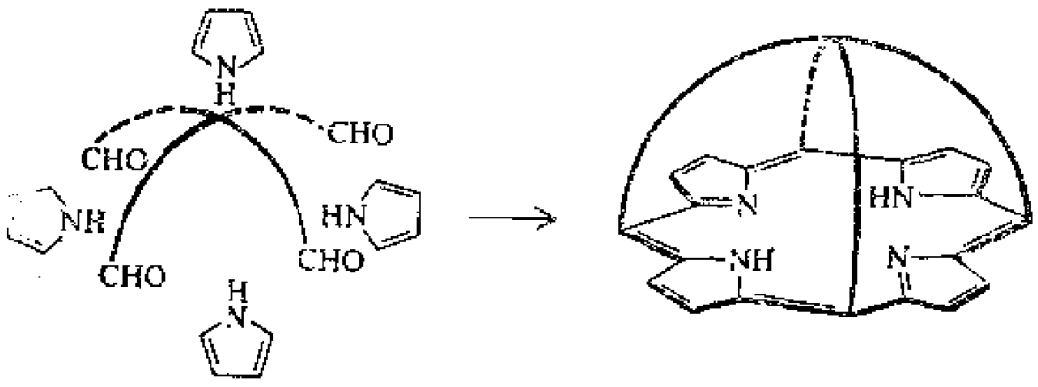
在1970年，有人第一次展示了一种有机铁配合物，它可以从空气中吸收氧气，只把一个氧分子吸收到它的分子结构中[14]。吸



收氧的过程发生在三苯基磷与 $(Bu_4N)_2\{Fe_2\ [S_2C_2(CF_3)_2]_4\}$ 的反应中。X射线研究表明，氧分子插入铁和磷之间得到一个氧化加成物，$(Bu_4N)\{(C_6H_5)_3POFe\ [S_2C_2\ (CF_3)_2]_2\}$。在制备这个配合物时，E.F.Epstein I.Bernal 和 A.L.Balch 发现，这一化合物要比原来制备的类似的钴配合物稳定得多。

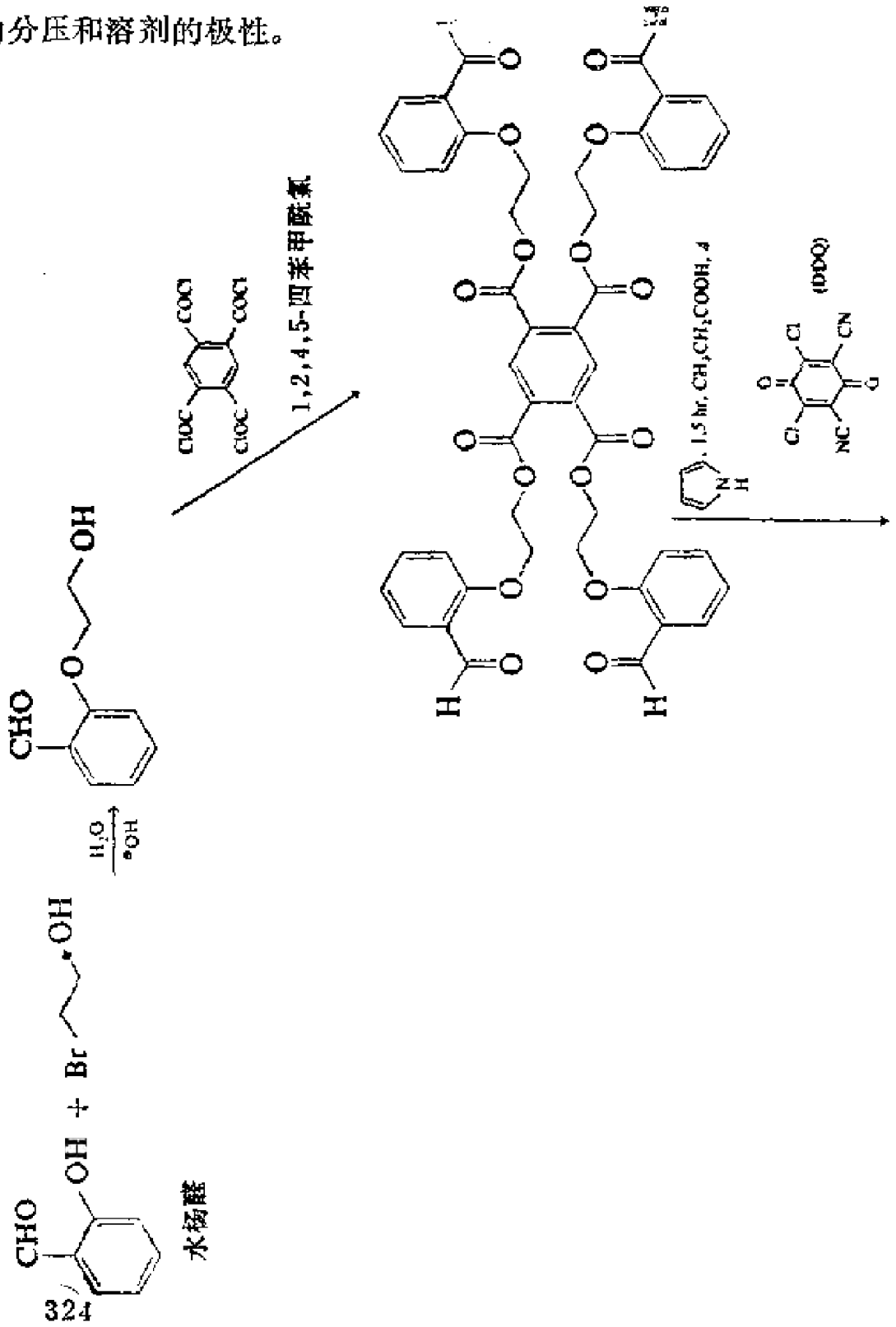
近期的研究方向是合成一些能够更好地模拟血红蛋白和肌红蛋白的配合物，以便研制出具有普遍意义的活化氧的化合物。在1973年和1974年，人们设计了一些模型系统。因此我们将更多地关注氧分子和一氧化碳与金属卟啉配合物的相互作用，以作为具有生物意义的血红素蛋白的模型。

（1） Baldnin模型 Baldnin 等[15]首先合成了围绕一个Fe（Ⅱ）原子的类似卟啉结构的化合物，它在溶液中可以可逆地结合氧。可是这一反应仅在 −85℃ 时才存在。后来，他又发展了一个简单的方法以制备一个“笼形”或一个“帽形”的卟啉分子。这样做是为了模拟血红蛋白的疏水袋，以期在结合氧的时候，不发生不可逆的 Fe(Ⅱ)→Fe（Ⅲ）的过程，而同时在室温可将O_2可逆地结合在模型分子上[16]。为此他们尝试用适当的四醛基化合物与吡咯直接缩合，作为合成“帽形”卟啉的方法。其设想如下：



适当的四醛基化合物是由水杨醛制得。整个合成方法见图7.3。相应的“帽形”卟啉—Fe（Ⅲ）配合物在苯中被还原得到

晶形的亚铁卟啉，这个晶体在溶液中能可逆地氧合。含有这一氧配合物的溶液的动力学稳定性依赖于许多因素，例如温度、卟啉的性质和配位情况、轴上的碱（1-甲基咪唑要比吡啶更好）、氧的分压和溶剂的极性。



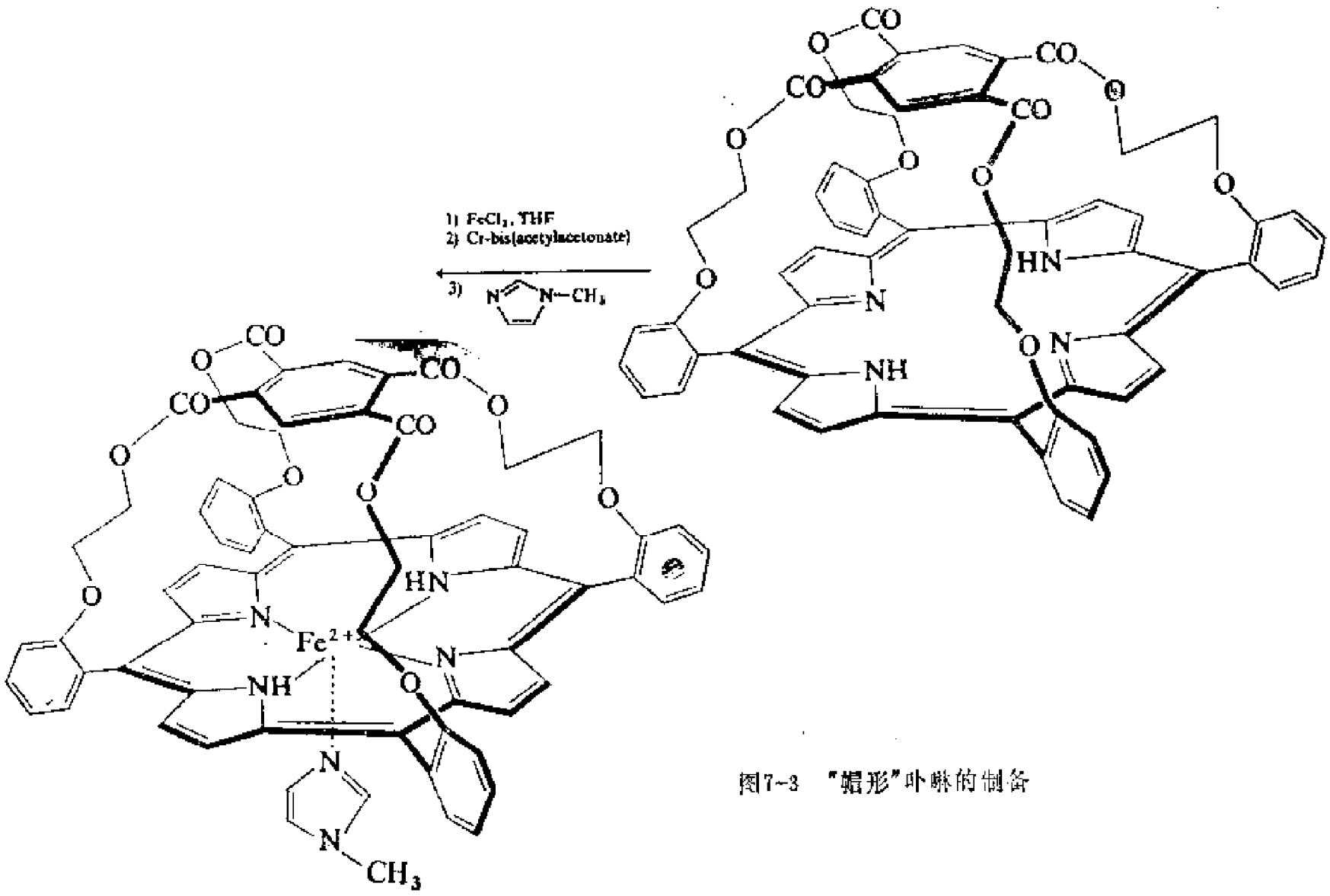

1) FeCl2, THF
2) Cr-bis(acetylacetonate)
3)
N
N—CH3
CO
O
HN
N
NH
Fe2+
CH3

图7-3 "蝠形"卟啉的制备

（2） Traylor的肌红蛋白模型　应用不同的方法，Traylor等[17]将一个 Fe（Ⅱ）原子引入到修饰的卟啉环中。这个卟啉环带有预先设计的咪唑侧链，以模拟血红素蛋白中相邻的咪唑基。这种人工的肌红蛋白的活性位置中有一个邻近的组氨酸残基，它能共价地结合在卟啉环上。它是从自然界中的叶绿素 a 经下列化学变化顺序得到的（图 7-4）。这一策略性安置的咪唑基造成了一种物理和化学的环境，去诱导合成的分子正铁血红素

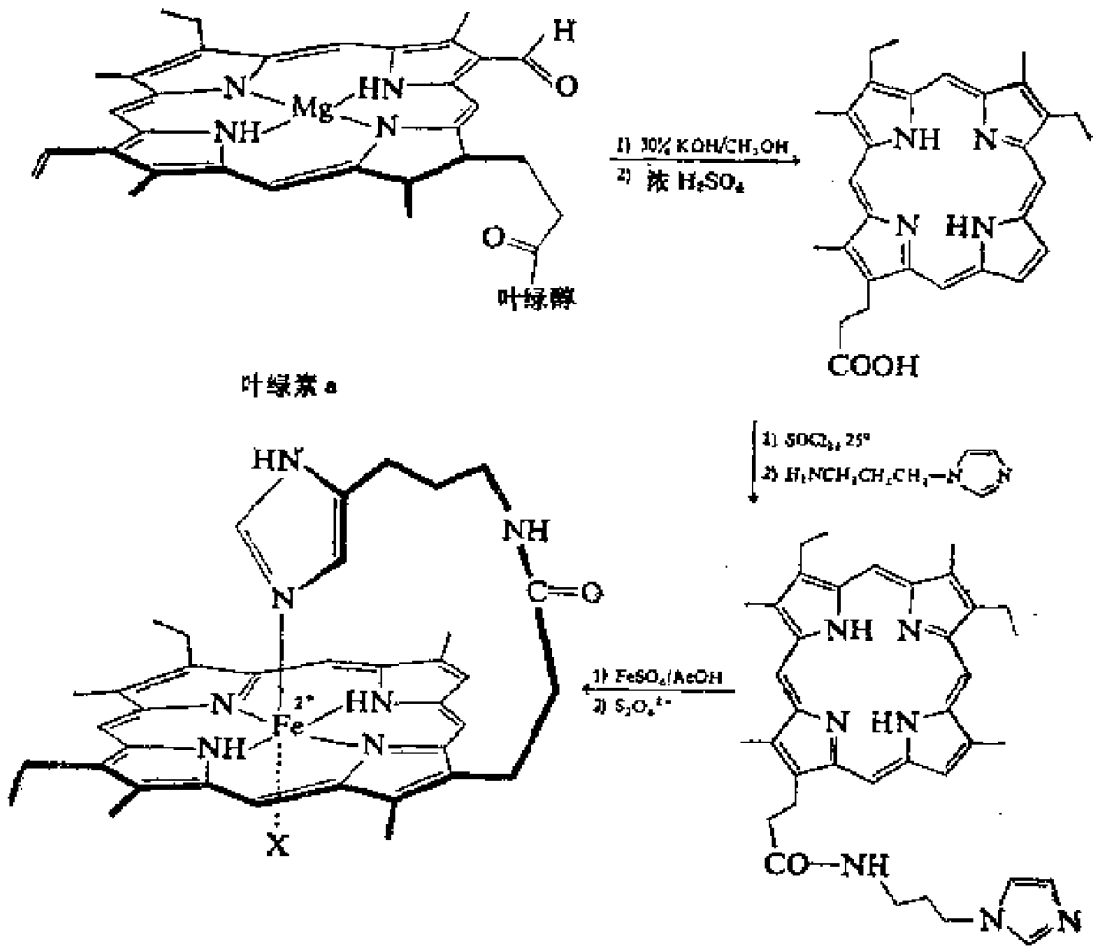


图7-4　Traylor制备人工肌红蛋白活性部位的方法

(Protoheme)以类似自然界分子的方式可逆地结合氧分子(但仅在－45℃时)。在－45℃的CH_2Cl_2中，模型显示了与室温下抹香鲸肌红蛋白几乎相同的与氧的结合常数。这一结果表明，蛋白质对于活性部位来说也许并不象我们以前所认为的那么重要。如果将咪唑基换成吡啶分子，这一化合物就不再结合氧，而使铁被氧化成高价态。所以血红素中咪唑环的碱性和它与 Fe（Ⅱ）离子的几何关系才产生了对氧独特的结合力。这一模型结合 CO 的能力远大于结合O_2的能力。

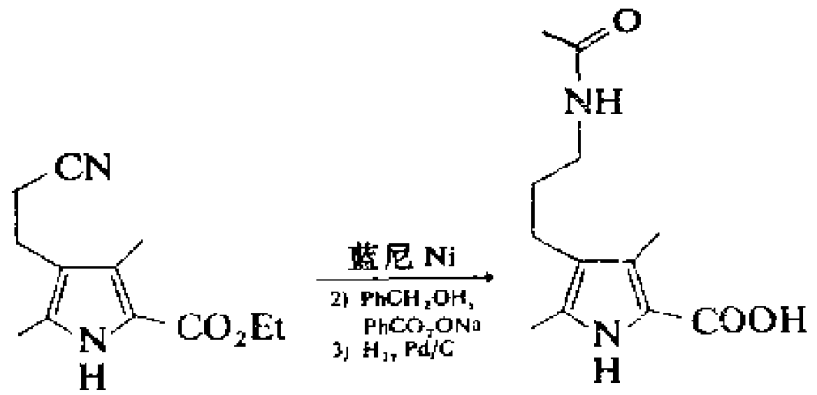
当把模型化合物溶于一个聚苯乙烯的膜中，同时将它冷冻起来，也可以测出此时对氧的结合率。现在甚至可以合成一些类似活性部位的物质，将它嵌在塑料膜上，以便在人工肺上行使转运氧的功能。当然，只有当新的模型发展到在室温能更有效地结合氧而又不至于被氧化时，这种技术才真正能用于实际当中。在1975年以前，人们只在低温或非生理介质中，观察到含血红素的模型配合物可逆地结合氧。

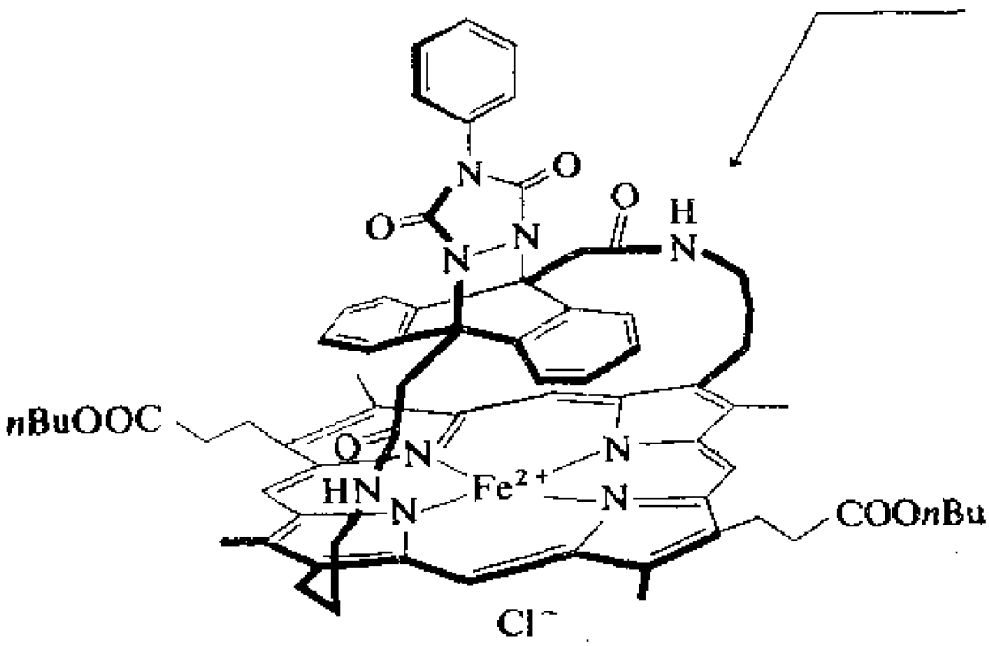
（3） Traylor 的空间效应模型　卟啉体系紧紧地靠近蛋白质中某些肽链的残基，会对CO或O_2与Fe（Ⅱ）离子的络合产生一些空间上的位阻。1979年，Traylor 等制备出两个前述模型的变体去估计这种空间效应[18]。图7-5说明了这些被称作环芳烷卟啉（cyclophane porphyrins）分子的合成方法。

利用这两个新的更复杂的血红素模型，他们引进了许多远端侧链的空间效应，因为蒽环与卟啉环之间的距离要小于0.5nm。通过 Diels-Alder 反应将蒽系统转变为“塔形”（pagoda）系统，可以得到限制性更大、更紧的“袋子”。模型与1-甲基咪唑在二氯甲烷中的加成反应所得到的分子，显示了前面观察到的“笼形”血红素五配位的可见光谱。相应的 CO 配合物也在干燥的苯中制得，这个配合物相当于单羰基血红素。因此卟啉环上方的蒽环大大降低了它对第二个 CO 分子的亲合力。比没有空间效应的螯合血红素，结合率降低至原来的 10^3 份之一。在“塔形”

分子中额外的空间效应因素的存在，使 CO 的结合率进一步降低至1/10，因此这些动力学模型说明，CO 结合率的大大降低可以归因于合成的血红素袋中的空间位阻效应[18]。

（4） Bayer模型系统　1977年，E. Bayer等人首次合成了埋于一个多聚网络中的血红素[19]，它的结构如图7-6所示。这种



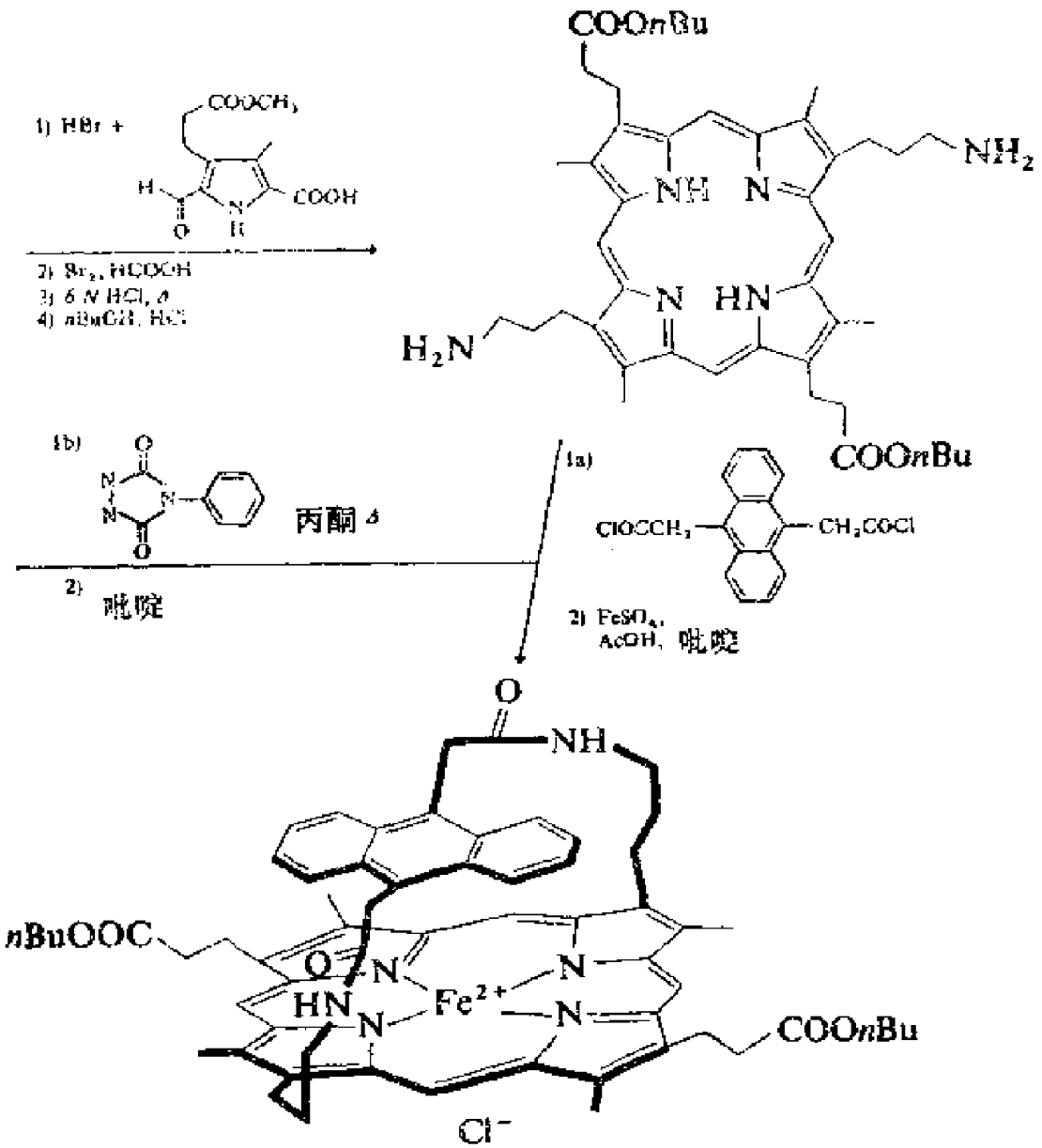


"塔形"卟啉

图7-5　环芳烷卟啉的制备

结构是利用液相肽合成方法由聚〔乙二醇双（甘氨酸酯）〕和聚氨基甲酸乙酯（由聚乙二醇和二异氰酸酯合成）制得。在合成的最后阶段，铁离子是以 Fe（Ⅲ）存在的，因而在吸附氧以前要用连二硫酸钠还原。

多聚体有血红蛋白和肌红蛋白的下述性质：（a）模型在水中



环蕙面卟啉

有较大的溶解度，因而可获得高浓度的氧；（b）通过高聚物的

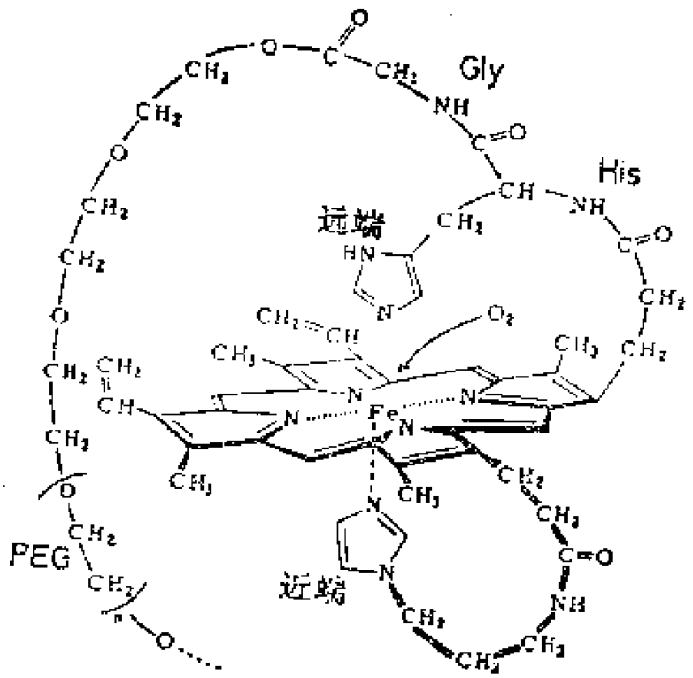


图7-6 Bayer的血红素高聚物

官能基化，可以阻碍氧配合物的不可逆的氧化；（c）能模仿远端的咪唑。

此外，相当于自然界氧载体的邻近的第二个咪唑配体，也可以通过修饰卟啉的丙二酸侧链引入。这样，血红蛋白和肌红蛋白中结合氧的活性部位的结构单位都存在了，尽管它们还是以一种不同方式排列的[19]。还要特别指出，氧的配位位置被组氨酸和合成的高聚物屏蔽着。在25℃时，配合物的氧吸附曲线与肌红蛋白的值很吻合（26.7到160.0帕）。

（5） Collman模型 另一个在建立血红素蛋白的氧结合部位的生物有机模型领域内的先驱是 Collman[20, 21]。他修饰了卟啉分子的几何构型，以使铁的氧化过程在空间受阻而减少。这种努力包括建造一个在环的一侧伸出四个大的O-新戊酰胺苯基的卟啉环。环的另一侧留下不受阻碍，以期能被一个大的轴上的咪唑基保护（图 7-7）。尽管这个新化合物不像是肌红蛋白的模型，而更像是铁血红素本身，但它可以阻止血红素-血红素接近和Fe-O-O-Fe 键的形成[61]。Collman 把这个模型叫做“尖桩

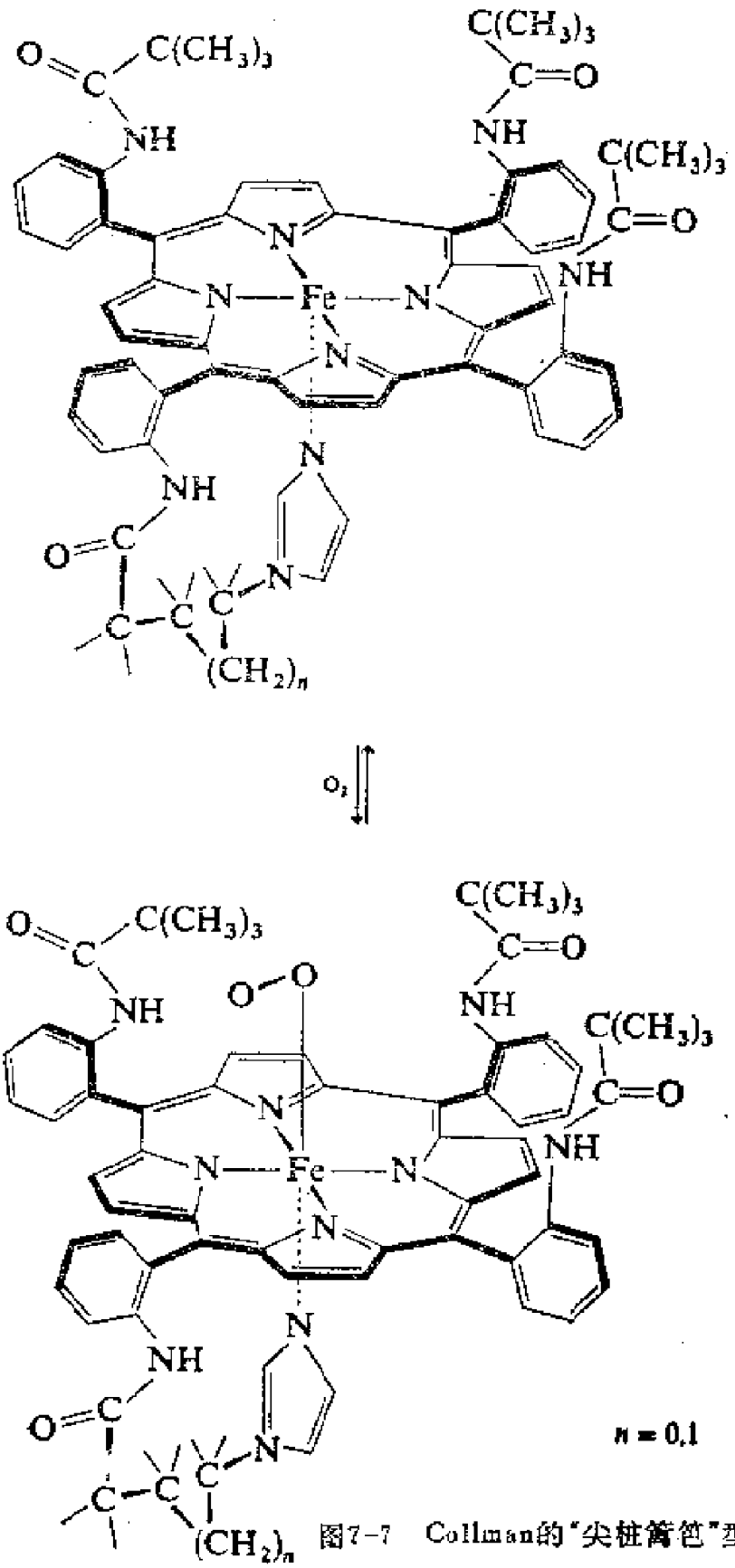
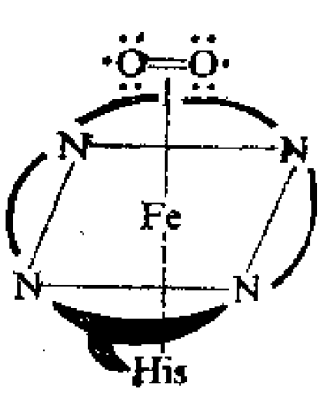


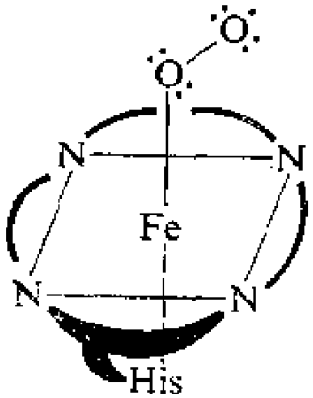
图7-7　Collman的"尖桩篱笆"型卟啉模型

篱笆”（“picket-fence”）卟啉。在室温，它能可逆地结合氧分子，并且氧的配合物是晶态的。这一模型系统在结合氧时显示了重要的协同性，但到目前为止仅适合于固态。在O_2分压低时，以低亲合O_2的形式存在，而当氧的分压高时，就演化出与O_2有较高亲合力的形式。这种在氧分压高时（如在肺中）产生高亲氧力，在氧分压低时（如在肌肉和组织中）产生低亲氧的能力，对于有效地运输氧是非常重要的。就这点来看，这一模型较定量地模拟了血红蛋白[21]。

Collman为了准确地测量模型中氧-铁链的物理性质，他发现氧分子以一种“端连的模式（Pauling的模型）与正铁血红素的铁结合，而不象有些理论（Griffith的模型）提出的采取侧面结合的方式。实际上，氧分子结合到某些含铁的生物分子上的方式，已成为争论了将近30年的理论题目。最后，通过对Collman模型的X射线晶体衍射的研究证明，氧采取端连方式结合，而这个建议是由L.Pauling在1948年提出的！



Griffith模型



Pauling模型

人造的含锌、锰、铜和镍的血红蛋白也都已合成出来，他们的性质可以与原来的铁蛋白相比较。但这些人造的系统不能可逆地氧合。比较而言，钴取代的血红蛋白和肌红蛋白能发挥作用，但是他们对氧的亲和力只有原来氧载体的 1/100—1/10。实际

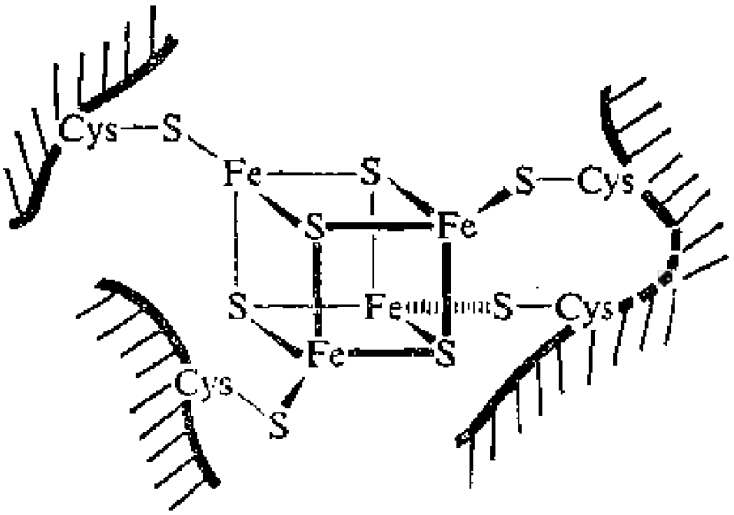
上，自从 1930 年起，人们就已经知道一些合成的钴配合物能可逆地结合氧。在元素周期表中，钴与铁相邻，人们希望阐明钴配合物的作用，也许能更清楚地阐明血红蛋白和自然界中其他的氧载体。换句话说，Co(Ⅱ)配合物可以作为血红蛋白和自然界中其他氧载体的模型来认识。另一个选择钴的原因是，有关钴系统的很多热力学数据是容易得到的。

（6） 其他的模型

除了铁-卟啉化合物外，还有许多非血红素蛋白质参与了多种氧化-还原过程。它们含有相对较多的铁和硫，因此被称作铁-硫蛋白质[22]。这些蛋白质广泛存在于自然界所有的生物体内，而且它们的生理作用是传递电子，而不是化学转化的催化剂。其中包括红氧还蛋白（rubredoxin）、肾上腺皮质铁氧还蛋白和铁氧还蛋白。它们是生物体中最普遍的一些电子载体，直接或间接地参与了众多的代谢反应，尤其在光合作用过程和植物以及细菌的固定N_2和 CO_2 的过程中。第一个铁氧还蛋白是在 1962 年从巴斯德(固氮)梭状芽胞杆菌和菠菜中分离提纯出来的。这个非光合作用的厌氧菌是世界上最古老的细菌之一。它们已在地球上存在了31亿年以上。

由于存在 Fe—S 发色团，并且分子量相对较低（6 000 到 12 000），使之成为可供研究的极好分子。目前，对于它们的作用机理还知之甚少，只知道它们起着强还原剂的作用。它们还有一个特点，就是在酸性溶液中易放出H_2S。据信，在地球上有机分子刚刚起源时，原始的还原性大气盛行的部分原因大概来自这种转化。因此铁氧还原蛋白也许能作为我们理解生命起源的一个重要纽带。

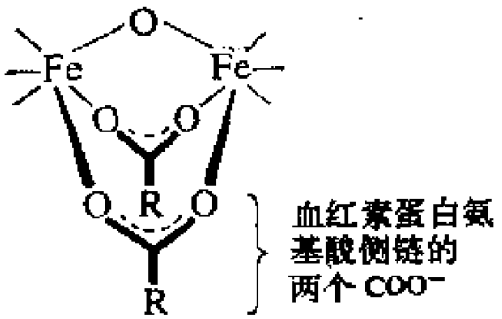
这些铁-硫氧还蛋白包含一个由铁和硫与肽链上的胱氨酸残基相连成为一个笼形簇。就是这些金属-硫桥与这些活性部位的生物学性质密切相关。硫配体使得 Fe（Ⅱ） 变得非常不稳定，这正解释了它在各种生物过程中具有很强的还原性质。这种笼形



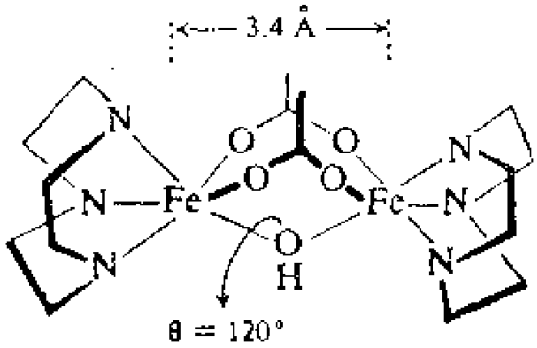
模拟铁-硫氧还蛋白活性部位的笼形簇

簇作为单电子催化剂，催化簇中Fe(Ⅱ) ⇌ Fe (Ⅲ) 氧化还原反应的进行。

Holm[23]为了阐明某些铁-硫蛋白和酶的活性部位，已合成了一系列Fe—S簇的类似物[24]。但迄今为止，合成的铁-硫簇的类似物还比较少。

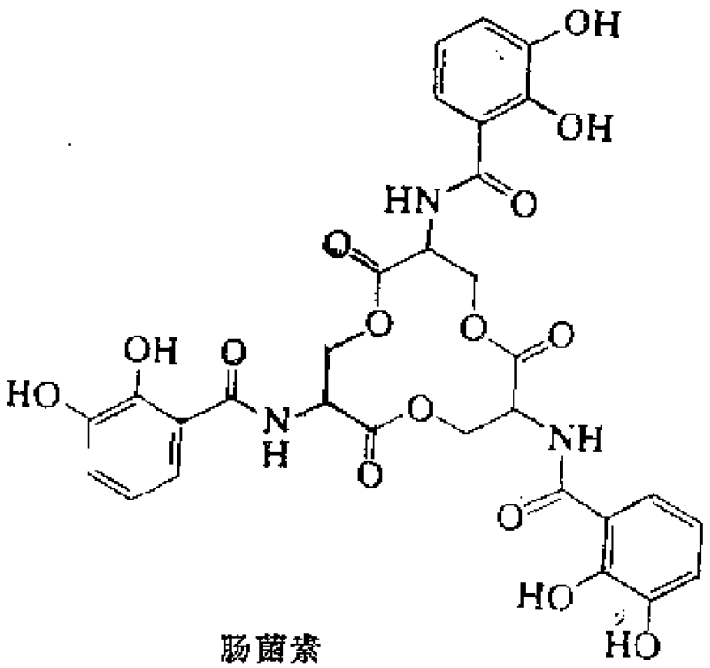


正如先前提到的，蚯蚓血红蛋白是一种存在于海洋无脊椎动物体内的蛋白质。它含有结合在氨基酸侧链的两个羧酸根上的一个氧桥-双核铁中心。S.J. Lippard等提出了生物学上已了解的这个铁-氧桥的模型[25]。下面的结构就是一个例子。Fe-O键的键长为1.78Å，但随着氧的质子化，键长增至1.96Å。这与明显



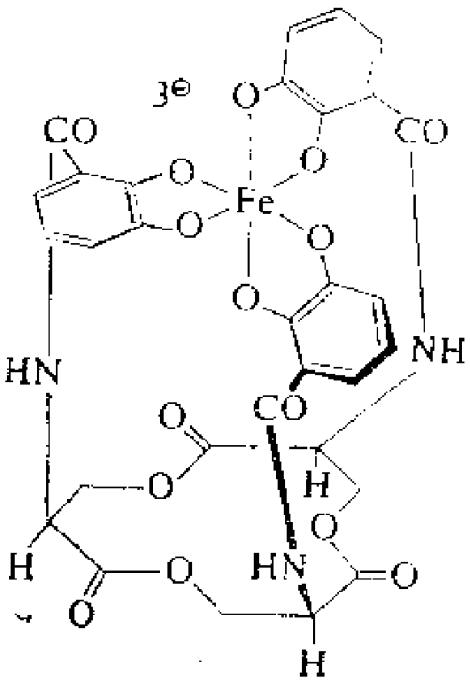
的能量变化相适应，这种能量变化对于氧分子在脱氧-氧合蚯蚓血红蛋白平衡中进行的双电子氧化加成产生有利的影响。正是这种有利的氧化还原化学在生物学中起着作用。

自然界中最强的铁结合剂是在肠道细菌中发现的肠菌素（enterobactin）。它含有一个大环上对称分布的三个儿茶酚单元。这些微生物逐渐形成一些特殊的铁的配基或含铁血黄素巨噬

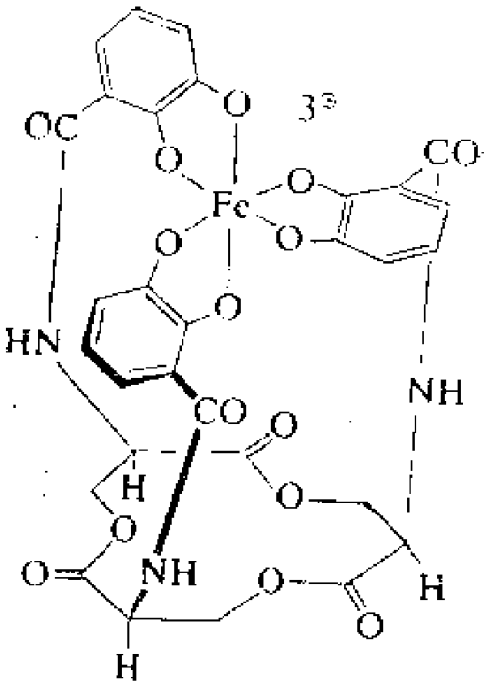


肠菌素

细胞以获取环境中的铁并将其运进细胞中。含铁血黄素巨噬细胞利用六个配位的氧以右手或左手螺旋将金属包在中心[26]。

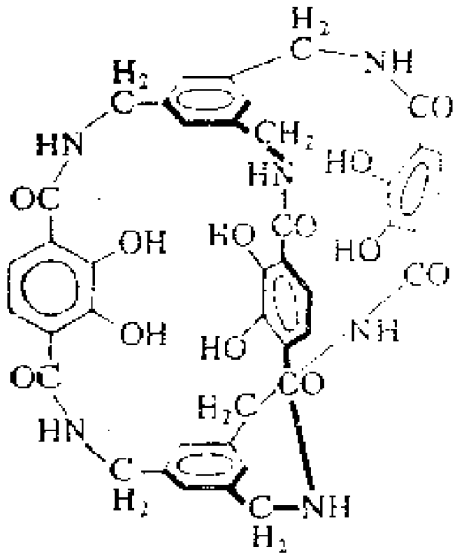


Λ-*cis* 型(右手)

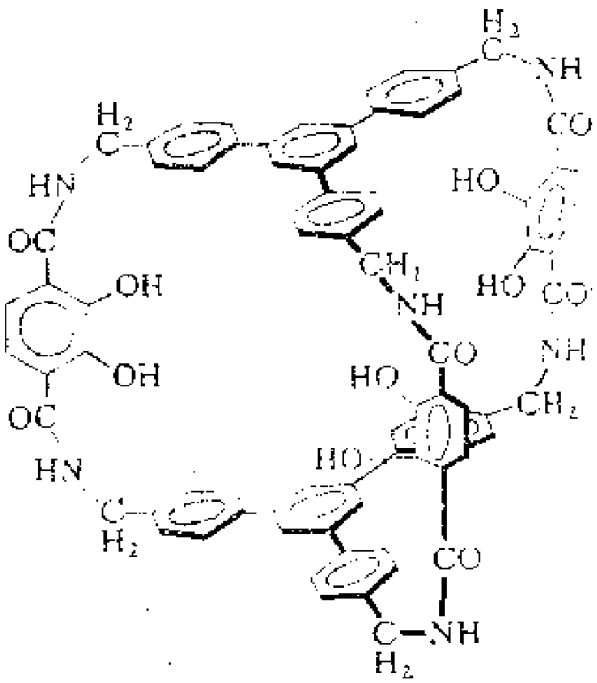


Δ-*cis* 型(左手)

目前已制得此类铁螯合剂的干性类似物[26, 27]。具有含铁血



26元环



42元环

黄素巨噬细胞类型作用的大分子洞穴也已由Vogtle 等合成[28]。以下将以两个分子对此略加说明，较小的受体对Fe（Ⅲ）结合得较牢，而较大的受体则结合得松得多。42元大环是目前已知的最大的分子宿主孔穴，它能够有效地裹住有机客体分子。此外，此分子可利用OH基进一步功能基化。

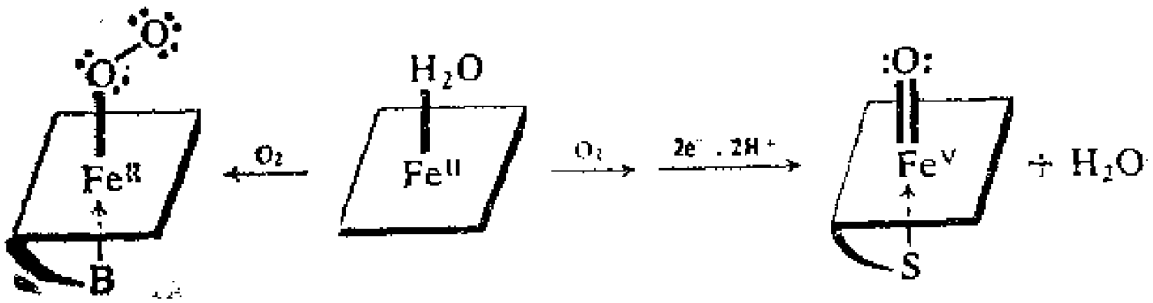
7.4.4 细胞色素P-450的模型

众所周知，人类利用酶分解食物，此过程中产生的电子透过线粒体，最终与氧分子反应生成水。反应过程中放出的热量用于产生高能磷酸酯。所有这些过程都要涉及氧化反应和由电子传递蛋白质——细胞色素进行的电子传递。

在血红素蛋白质中，有一类能够代谢多种化合物的酶，统称为细胞色素 P_{-450}[29]。它在自然界中普遍存在，常见于动物、植物和细菌中。它们参与多种代谢过程。这些血红素蛋白质是单加氧酶，消耗一分子氧，催化底物羟基化。O_2 的还原裂解导致一个氧原子结合至底物中，另一个则转成水。

$$\underset{\text{底物}}{R\text{—}H} + O_2 \xrightarrow{2e^-,\ 2H^+} ROH + H_2O$$

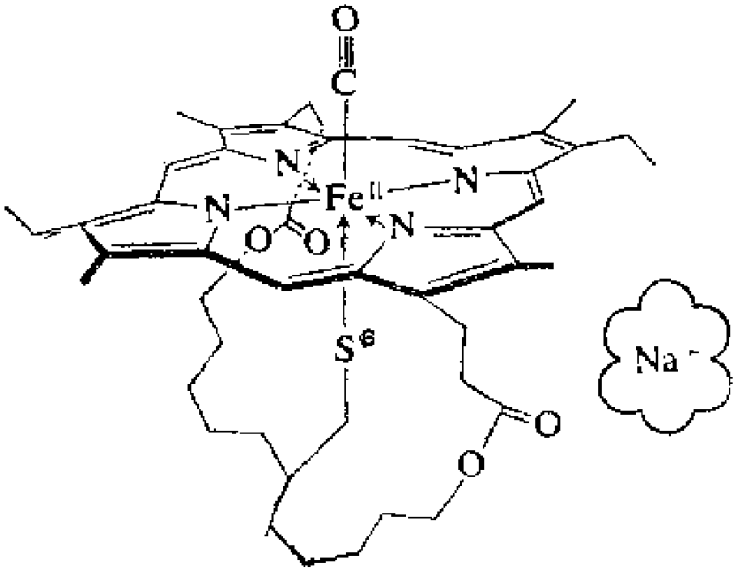
在哺乳动物中，细胞色素 P_{-450} 扮演了多种不同的角色，它参与了类固醇的生物合成，脂类物质、药物和烃类物质的羟基化[30]。一个突出的例子是吸烟时烟叶中的多芳环化合物在体内的氧化，并因此致癌。细胞色素 P_{-450} 最重要的性质是能从氧分子那里获得极强的氧化力。这与我们所熟悉的其他血红素蛋白质的转移氧或转移电子的作用形成鲜明的对照。细胞色素 P_{-450} 的活性部位也含有一个结合于卟啉基上的铁原子，但是与运输 O_2 的蛋白质相比，后者有一个碱性的咪唑基，而前者拥有一个来自半胱氨酸残基的巯基。而且细胞色素 P_{-450} 与 O_2 结合后以高铁形式（Ⅴ价）存在，并形成一个铁氧配合物。Collman和 Battersby



❶ 载体分子
（B＝[illegible]）

P-450上"活化"的氧
（铁-氧络合物）

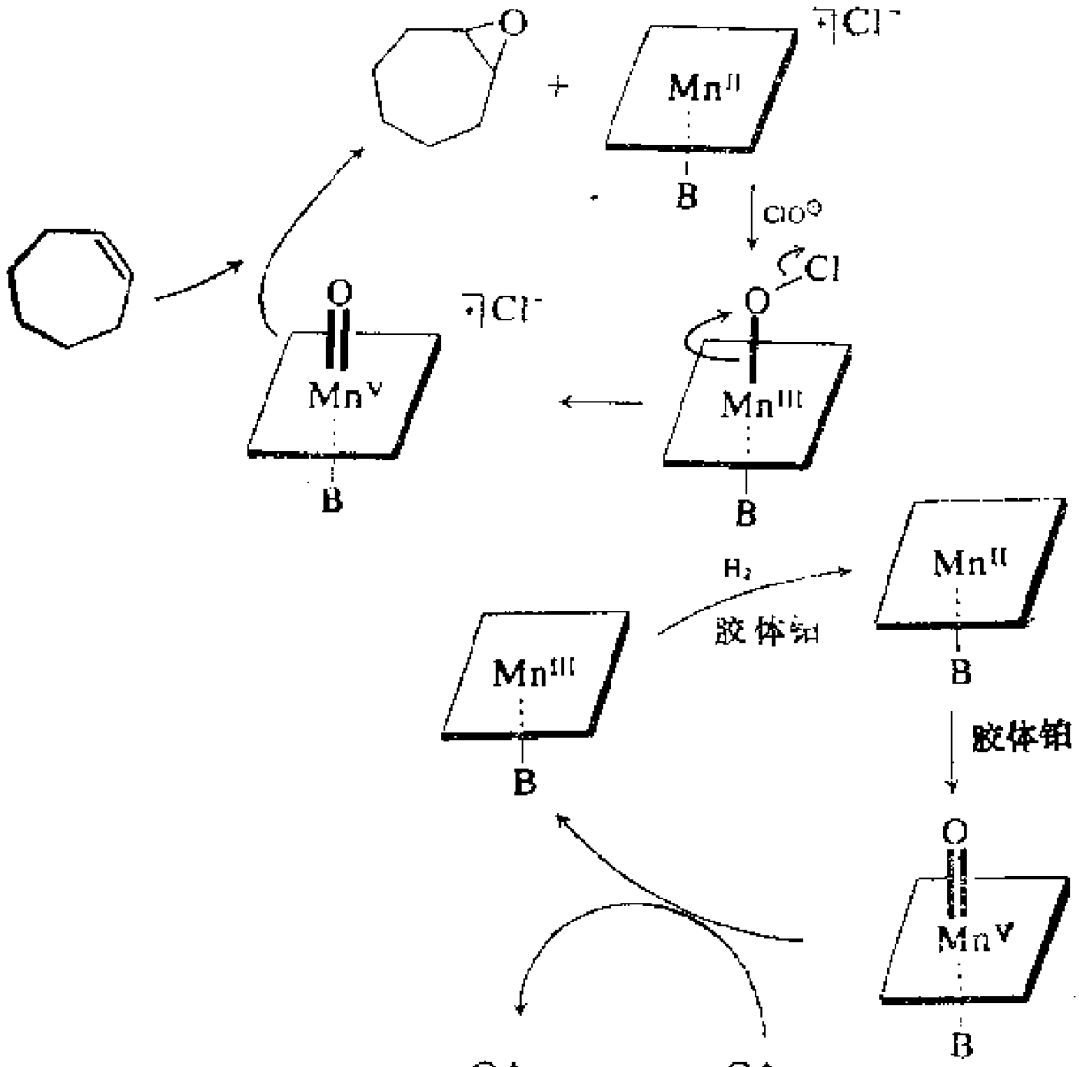
都曾尝试着合成带硫醇尾巴的卟啉类化合物，以建立这类氧化蛋白的模型[30, 31]。细胞色素 P_{-450} 与 CO 的加成物显示出异常的"超"—Soret* 吸收光谱（λ_{max}—380, 450nm）；得到一个与 S—Fe—CO 键合有关的双峰。模型化合物显示了相同的特征光谱性质，这说明它是一个可行的模型，能用于进一步的研究。同时，实验结果也显示出铁依然以亚铁的形式存在。



CO结合于巯基被缚的卟啉

铁卟啉分子的有机金属化学的重要性质愈来愈得到人们的重视，利用一些模型可以作为进一步阐明催化反应机制的良好基础，而在这些催化反应中，细胞色素 P_{-450} 又起了很重要的作

* Soret光谱：大的卟啉共轭体系的特征吸收光谱。



乙酸橙花叔醇酯

或

乙酸香叶叔醇酯

100%

93%

反式环氧化合物

图7-8 Mn(Ⅱ)-卟啉催化烯加氧反应

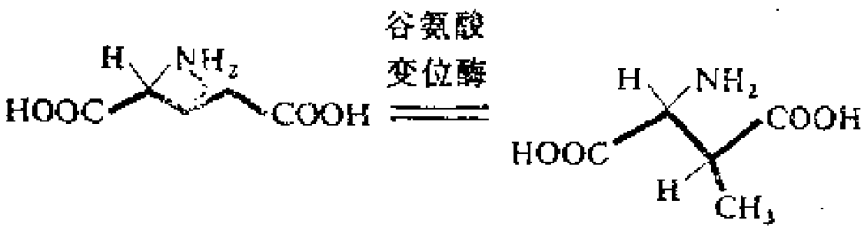
用[32]。在这方面 Collman 和 Tabushi 报导了高度有效的合成模型，这些模型利用了Mn(Ⅱ)-卟啉和一个取代的咪唑配体，以催化来自O_2或ClO^-的一个氧原子加到链烯上[33, 34]。某些例子中，利用胶态的钯作载体，观察到了区域选择的多链烯的单环氧化作用，并且催化剂可循环使用（见图7-8）。

7.5 钴和维生素B_{12}的作用

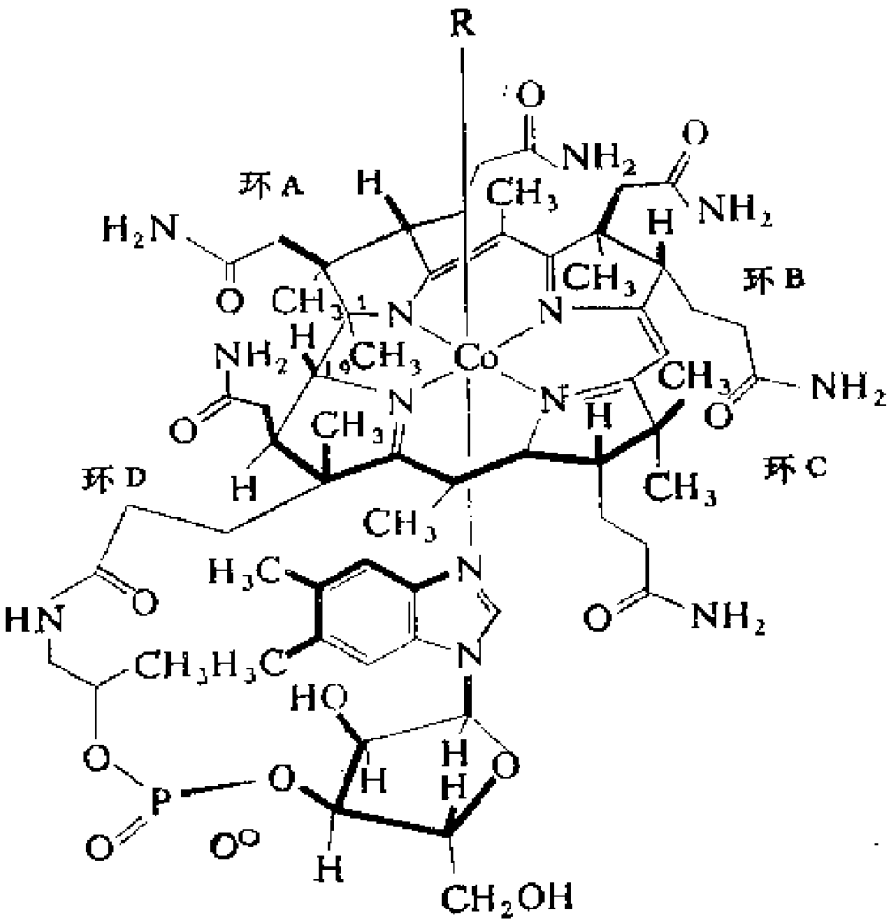
尽管钴可以以（Ⅱ）和（Ⅲ）氧化态存在，但生物体内最重要的含钴化合物维生素B_{12}或钴胺素中的钴是以（Ⅲ）形式存在的[35]（见图7-9）。钴胺素及其相关化合物是一类具有重要生物学意义的化合物，尤其是在细菌中，它们参与了多种生物体内的活动。维生素B_{12}也是人、可能所有动物、植物的营养必需品。在活细胞中将糖、脂肪和蛋白质转变成能量的反应中，钴胺素起着至关重要的作用。恶性贫血是老年人中一种危害性较大的疾病。这种病，在哺乳动物中往往伴随着尿中甲基丙二酸排泄的增加。而今，通过注射100μg 维生素B_{12}注射液，可以有效地控制这一疾病。

7.5.1 维生素B_{12}的结构

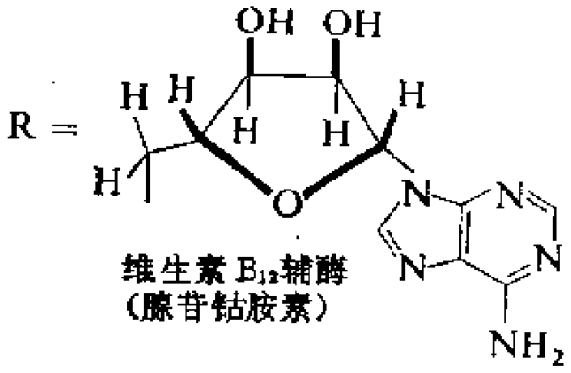
维生素B_{12}(氰钴胺素；R═—CN)是自然界产生的最复杂的配位化合物之一，同时也是自然界中已发现的最复杂的非多聚化合物（图7-9）。在20世纪50年代，Barker证明维生素B_{12}的衍生物参与了下述反应：



谷氨酸　　β-甲基天门冬氨酸



R = CN 维生素 B_{12}



维生素 B_{12} 辅酶
（腺苷钴胺素）

R = CH_3，甲基钴胺素

图7-9　维生素B_{12}的结构

由此意识到，钴胺素的生化活性形式是 B_{12} 辅酶，它包含一个以5′碳原子与维生素 B_{12} 的中心钴原子形成共价结合的腺苷。虽然维

生素 B_{12}(氰钴胺素)向腺苷-B_{12}(辅酶)的转化似乎涉及到一个 CN^-被来自 ATP 的一个腺苷基取代，但是人们发现酶的转化还是相当复杂的。

VB_{12}的一个奇特的性质是它形成烷基衍生物的能力[35]。在Barker发现VB_{12}以前，人们曾认为即使 Co—C_α 键能存在，它也是不稳定的。因而 VB_{12} 是第一个，同时也是自然界仅有的一个水溶液稳定的有机金属化合物。它的全部的结构是由Hodgkin在Todd和 Johnson 的较早的化学研究上，借助于晶体学的工作揭示出来的。它的全合成是由Woodward和 Eschenmoser 小组在20世纪70年代早期完成的。

分子的核心象一个铁-卟啉系统，但是此处的环系被称为咕啉，并且四个修饰的吡咯环中，有两个是直接键合的(C_1—C_{19}连接)。所有的侧链都由乙酰胺或丙酰胺组成。其中有一个连在与核糖相连的磷酸异丙酯上，核糖上又接着一个二甲基苯并咪唑，最后以二甲基苯并咪唑与Co (Ⅲ) 离子相连。

7.5.2 维生素B_{12}在变位酶中的作用

令人奇怪的是，钴离子可以以 +1 (B_{12r})，+2 (B_{12r})，+3 (B_{12a}) 三种氧化态存在。事实上，烷基钴胺素的显著特性之一就在于Co—C键可能有三种裂解方式：

$$R—Co(Ⅲ)\longrightarrow R\cdot + \dot{C}o(Ⅱ)\quad(称作B_{12r}型)$$

$$R—Co(Ⅲ)\longrightarrow R^{\oplus} + \ddot{C}o(Ⅰ)\quad(称作B_{12s}型)$$

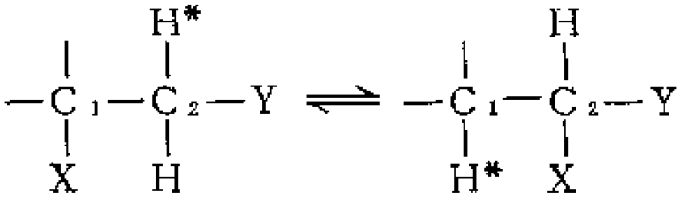
$$R—Co(Ⅲ)\longrightarrow R^{\ominus} + Co(Ⅲ)\quad(称作B_{12a}型)$$

B_{12r}型是一个亲核试剂（也是一个还原剂），而且据认为，辅酶VB_{12}是经过VB_{12}向ATP的亲核性进攻而形成的。在重氮甲烷存在下，B_{12r}型被转化为甲基钴胺素（R=—CH_3）。由上面可以看出，在B_{12}化学中可以形成烷基自由基、碳正离子或碳负离

子。无论是在细菌还是在肝中，5′-脱氧腺苷辅酶是维生素 B_{12} 最丰富的形式，另外也存在少量的甲基钴胺素。

Barker由依赖辅酶 B_{12} 的谷氨酸变构酶来表述的上述重排反应是一个非常奇特的反应。直到现在，在有机反应中，还没发现类似的化学反应存在。事实上，对维生素 B_{12} 的辅酶型结构的阐述并没能搞清它的机制。除了这一转化，还知道九个不同的酶反应需要辅酶 B_{12} 作为辅助因子。大多数在有机反应中还没有先例。现将它们列于图 7-10 中。在选择维生素 B_{12} 的衍生物作为辅酶，这些酶好像达到了一个非常复杂的化学顶峰，以致化学家们很难模拟。

有趣的是，所有上面提到的反应都可以被归纳成一个氢原子从碳迁移到邻近的一个碳上，同时伴随有基团X从邻近的碳原子迁移到氢原来结合的碳原子上。



利用大多数依赖辅酶 B_{12} 的酶，对这少见的碳骨架的重排进行了更详细的研究。当然，与机制有关系的最关键的问题是：1,2-迁移是怎么发生的？在研究机制的细节以前，让我们先看一些非常有用的实验现象。

人们观察到，对于甲基丙二酰辅酶A（反应7-2）来说，X基（—COSCoA）在分子内迁移了，同时在这一过程中迁移的氢并没有与水发生交换。在丙二醇的脱水反应（反应 7-4）和谷氨酸转化成甲基天门冬氨酸的反应中观察到了类似的现象。但是，对于后两种情况来说，在氢迁移的碳原子上发生了构型的转变。而对于甲基丙二酰辅酶A来说，从甲基迁移到琥珀酰—CoA的 C_3 位的氢与先前的—COSCoA基处于相同的空间位置。迁移过程中，构型得到了保留。

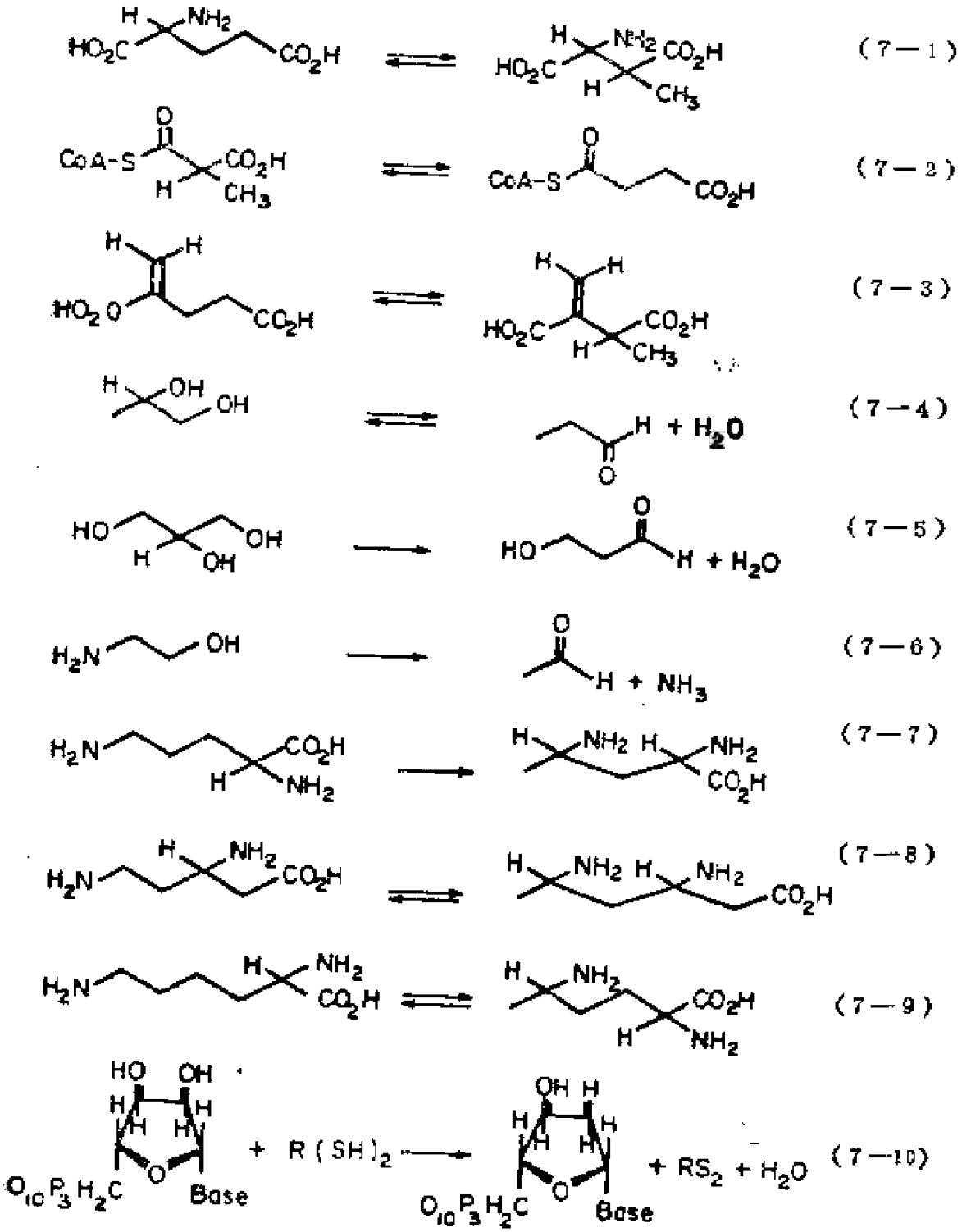
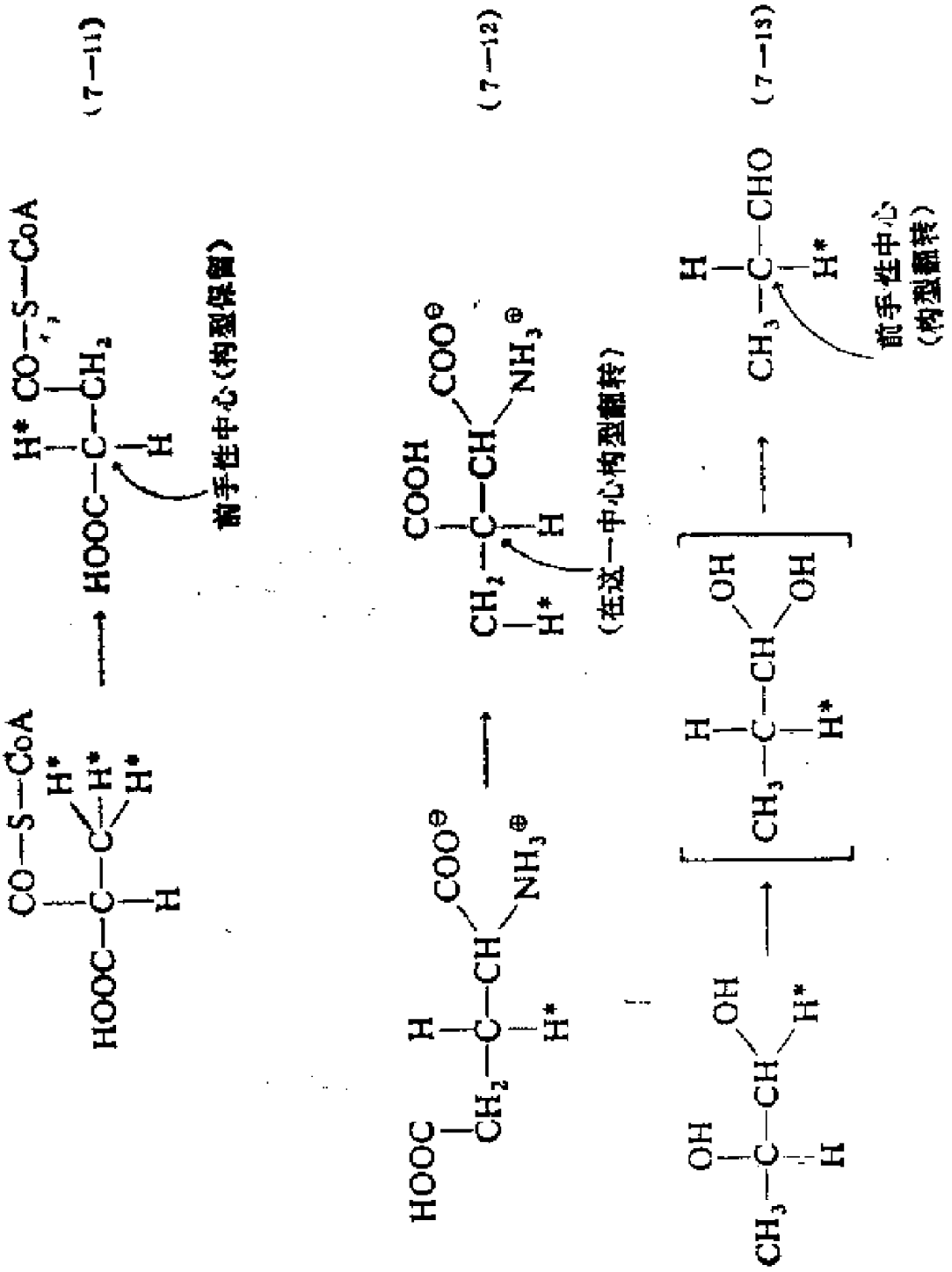
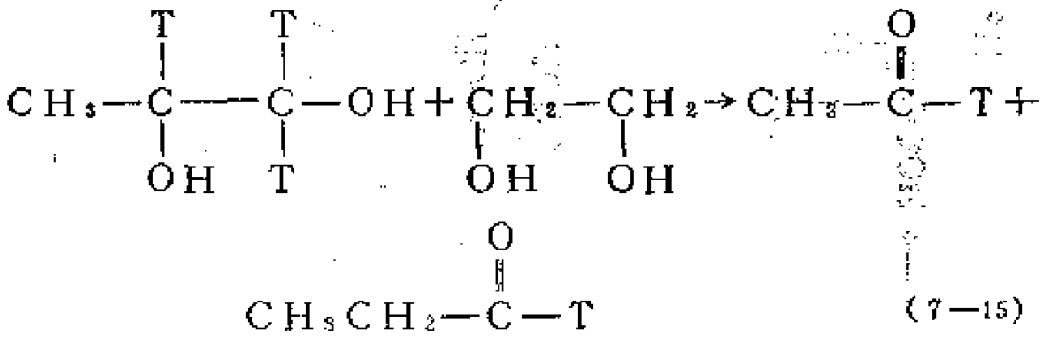


图7-10　辅酶B_{12}参与的十种不同反应



在最后一个例子中，迁移的氢没有与溶剂发生交换，但是与别的底物的相似氢发生了交换。转化反应相当于一个内部的氧化还原反应，但并非只发生分子内反应。因此依赖于辅酶维生素

(7—14)

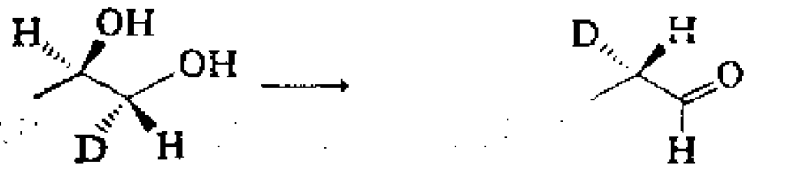


(7—15)

B_{12}反应的立体化学过程对于化学家来说是一个非常诱人的研究课题[35]。例如，丙二醇脱水酶也能催化1,2-丙二醇的氘代类似物的脱水反应（反应7-16和7-17）。只观察到了氘原子迁移的一种异构体。这些最初的实验表明脱水采用的1,2-迁移的方式[36]以及只有一定方向虚线的氢（或氘）才能发生迁移。

(7—16)

(1*R*,2*S*)-[1-^{2}H]丙二醇　　H在这一异构体中迁移，产生[1-^{2}H]丙醛

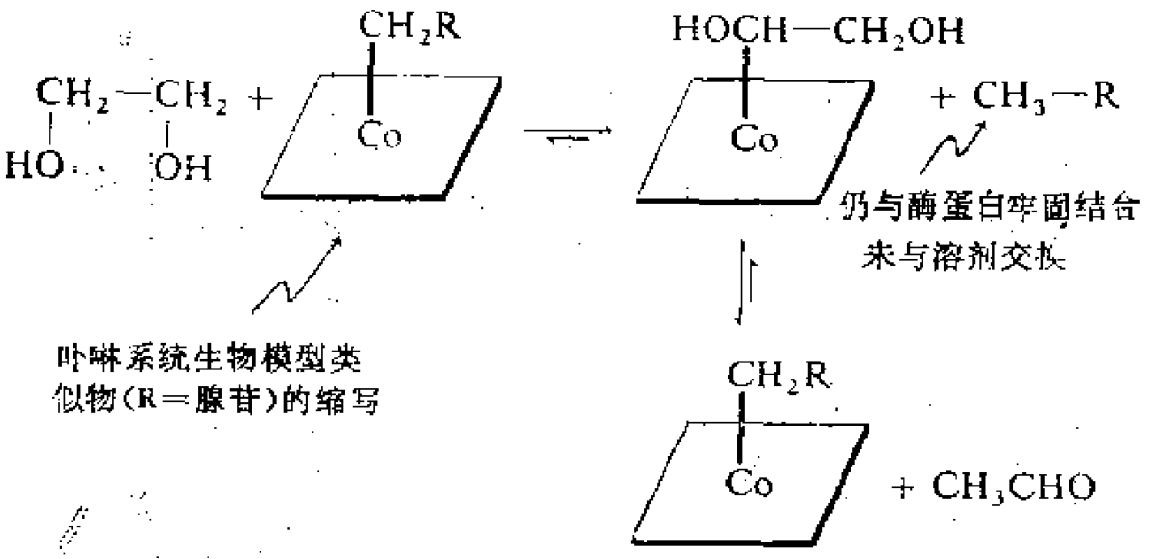


(7—17)

(1*R*,2*R*)异构体　　^{2}H在这个异构体中迁移产生2S—构型的(2—^{2}H)丙醛

更有趣的是，R. H. Abeles发现，当以1,2-(1-^{3}H)丙二醇作为底物时，辅酶的C-5′的H也被氚代了，并且氚能被转移到产物中去。根据Abeles的看法，5′-脱氧腺苷部位的三个不等氢原子都有同等的三分之一的几率被转回底物中。因此酶并不能区分C-5′上的两个前手性氢，同时表明辅酶 B_{12} 的作用基本上仅作为载体而已。这一明显缺乏立体选择性的反应涉及到Co—C键的均裂（见下面）。

实验证据表明，在一些辅酶 B_{12} 催化的重排反应的初始阶段，一定存在着一个与辅酶键合的中间体。利用乙二醇作为底物，可以表示如下：



这一迷人的生化转化过程的详细机制主要是通过Abeles[35]，Arigoni[36]，Dolphin[37—39]，Schrauzer[40—42]和Dowd[43]的努力，进一步阐述清楚的。为了简化起见，我们利用了各种咕啉系统的生物模型。通常用的是双一（二甲基乙二肟基）钴配合物（叫做钴肟，Cobaloxime），这一配合物反映了咕啉环中钴原子的许多性质（见图7-11）。

如果一个钴肟能与一个适当的碱基在轴位上配位，它在许多行为上就类似于维生素 B_{12}。当被还原到 Co（II）态时，它与

烷基卤化物反应形成烷基钴肟，它在许多性质和反应活性上类似于维生素 B_{12} 辅酶。

正如前面所知，断裂辅酶的 Co—C 键是催化循环中必须的

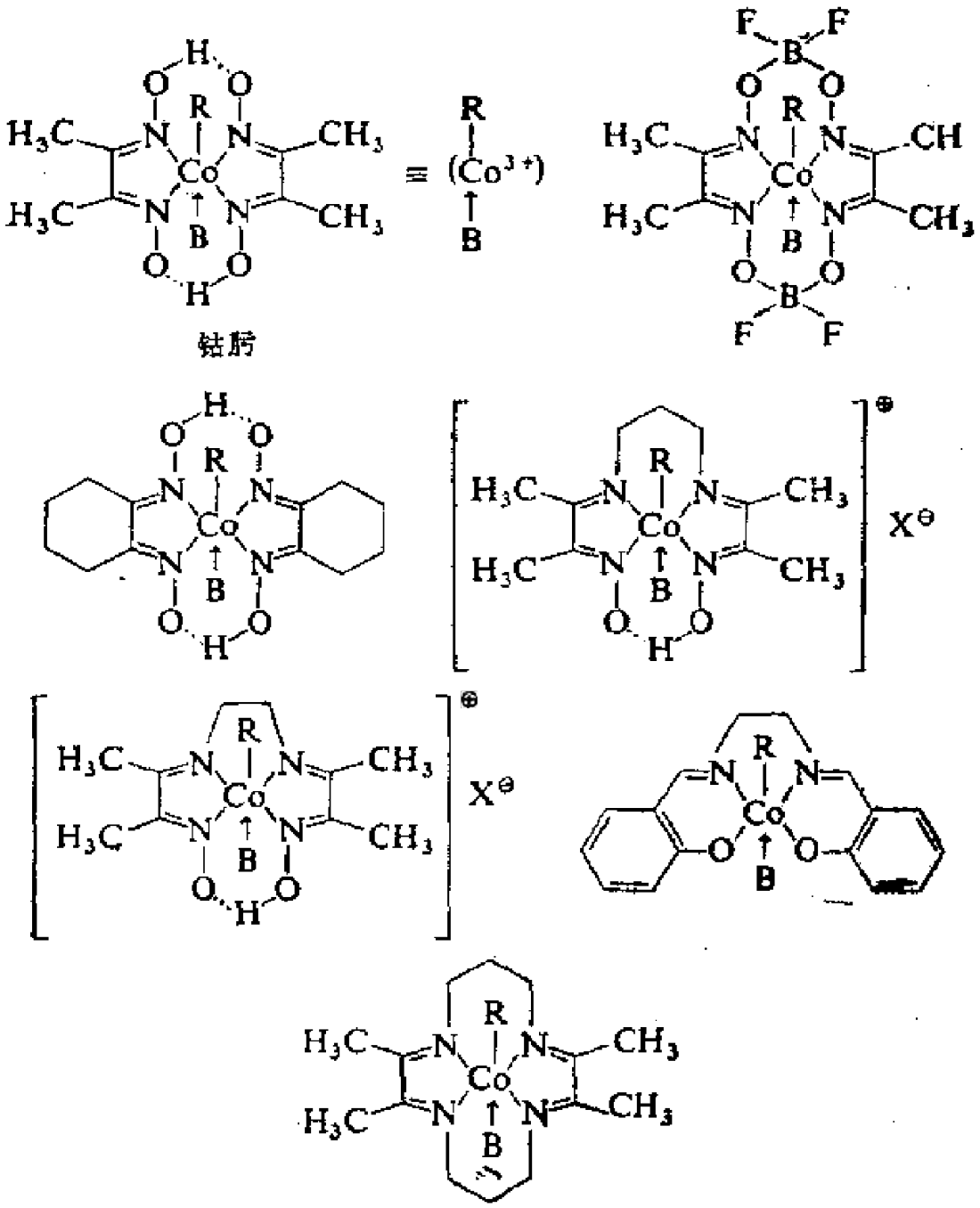
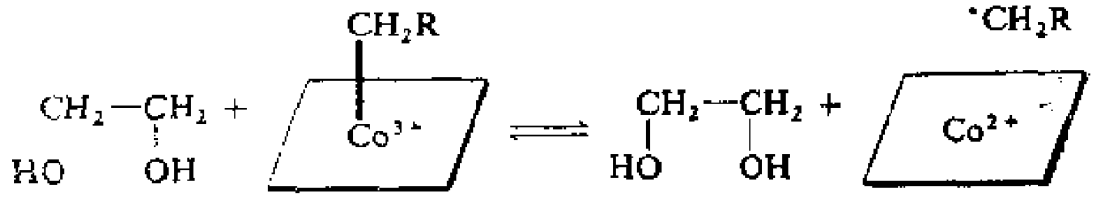
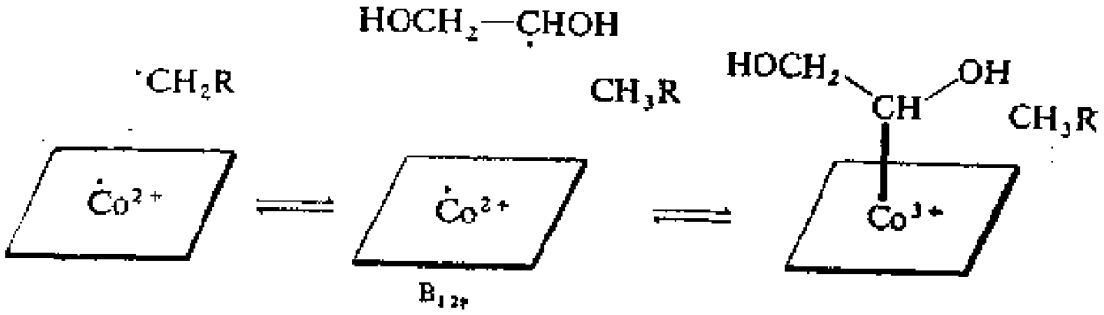


图7-11　咕啉类的生物模型

一步。以下实验结果还表明，这种断裂是均裂，产生 B_{12r} 自由基〔Co（Ⅱ）和一个脱氧腺苷的C-5′亚甲基的自由基〕。这一裂解也能用加热和光照的方法诱导实现。



这一均裂过程产生了一个活泼的中间体，它可以从底物中取得一个氢原子，形成CH_3—C′$_5$腺苷中间体（CH_3—R）和一个底物自由基：



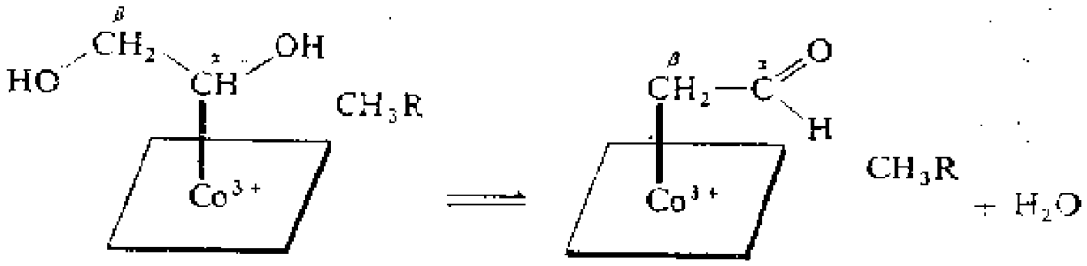
这一自由基与 B_{12r} 结合产生了一个新的以底物为配体的烷基钴肟。这样我们就完成了钴原子的转烷基化过程。在均裂过程中，Co—C 键是怎样被活化的呢？据认为，咕啉环上的丙酰胺侧链的存在和恰当的定向，使这一酶系统易于发挥作用。这可能是使咕啉环有些扭曲变形的关系[44]。对这一假说的支持来自这样一个事实：如果将侧链水解成一个相应的酸，结果得到一个无活性的辅酶 VB_{12} 分子。人们目前还不知道自然界为什么选择了一个均裂过程，这在辅酶化学中是一种绝无仅有的情况！Abeles 是第一个认识到维生素 B_{12} 化学的自由基性质的人。

可是，Halpern认为钴-碳键的强度和削弱它的力在了解钴-

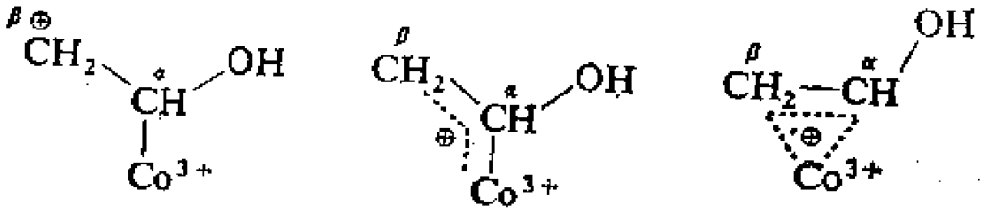
碳键的断裂中是最重要的。他测得这个有机金属键的键能为108.68KJ/mol，同时他确信这一键的强度部分依赖于咕啉环下方配体的碱性[45]，那一位置配体的碱性越弱，键也越弱。因此，辅酶 VB_{12} 可以作为自由基的可逆载体，这如同肌红蛋白的有机金属化合物是氧分子的可逆载体一样。

7.5.3 催化过程中的重排机理

现在，关键的问题是：下面的重排反应是如何发生的？



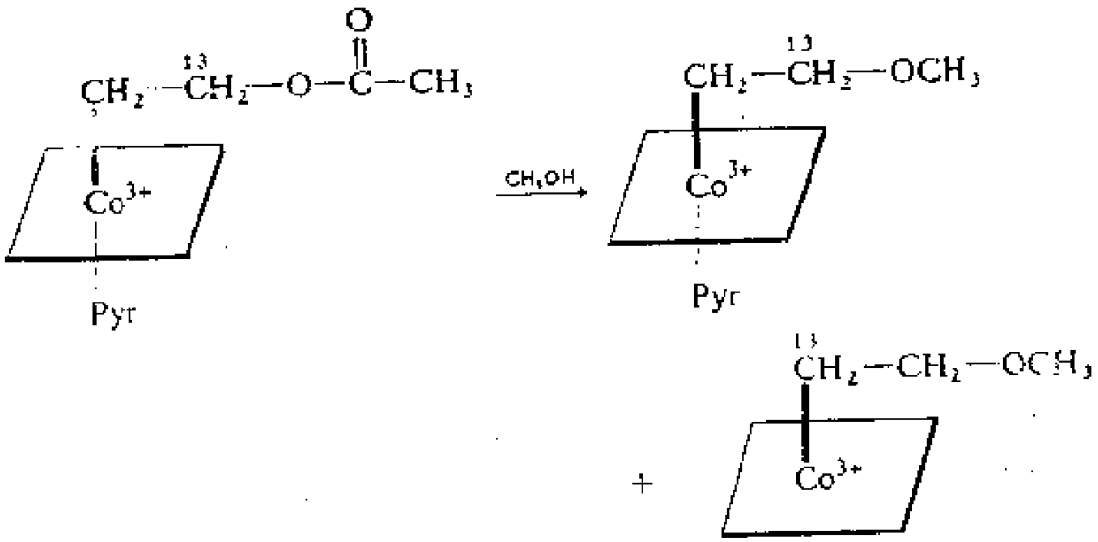
由于OH^-要作为一个离去基团，我们可以先看一下中间体电子构型的三种极端形式：



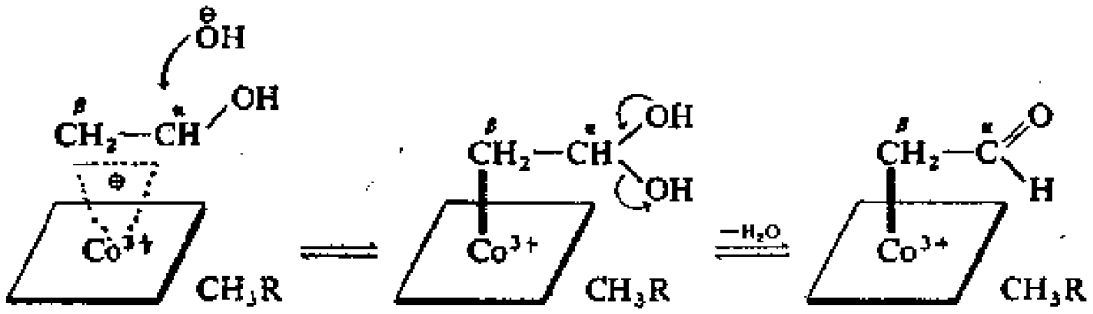
正碳离子为主　　离域的正碳离子　　π-配合物

模型研究表明，^{13}C-标记的2-乙酰氧乙基（吡啶）钴肟在甲醇中的溶剂化得到两个等量的^{13}C-标记的产物(见351页上)。这表明一个π型配合物中间体是一条最容易重排的途径。因而对于乙二醇脱水重排的反应应为（351页中所示）。

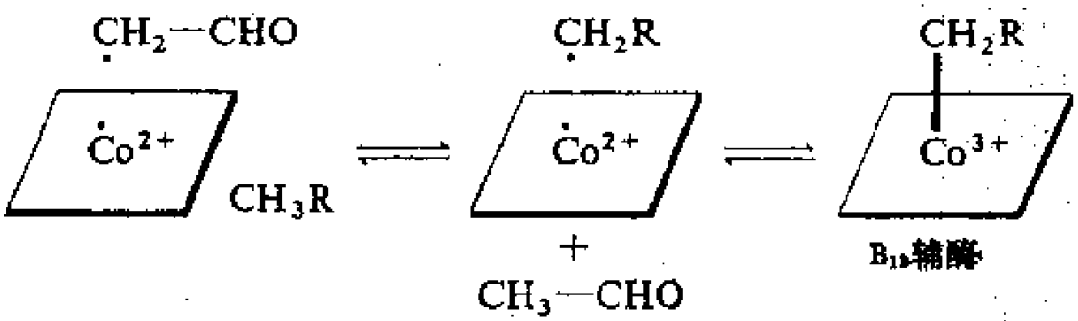
因为α碳上的羟基可以稳定正电荷，所以亲核试剂（H_2O或OH^-）更有可能进攻α位，以产生一个新的以底物β-碳与钴离



子结合的 σ-配合物。总之，反应的次序是：首先失去钴 σ-配合物的β-取代基，紧接着形成一个 π-配合物，最后离去的基团重



烯醇中间体　　醇中间体



新加在π-配合物上，产生一个新的底物-钴的σ-配合物。反应经过再次转烷基化，产生最初的辅酶B_{12}和脱水的产物，从而最终完成转化过程。

因此，VB_{12}化学中最关键的中间体是Co(Ⅲ)-烯醇的π-配合物。形成这一中间体的原因在于烯醇是一个富电子的基团，而金属（三价钴）是一个缺电子的基团。

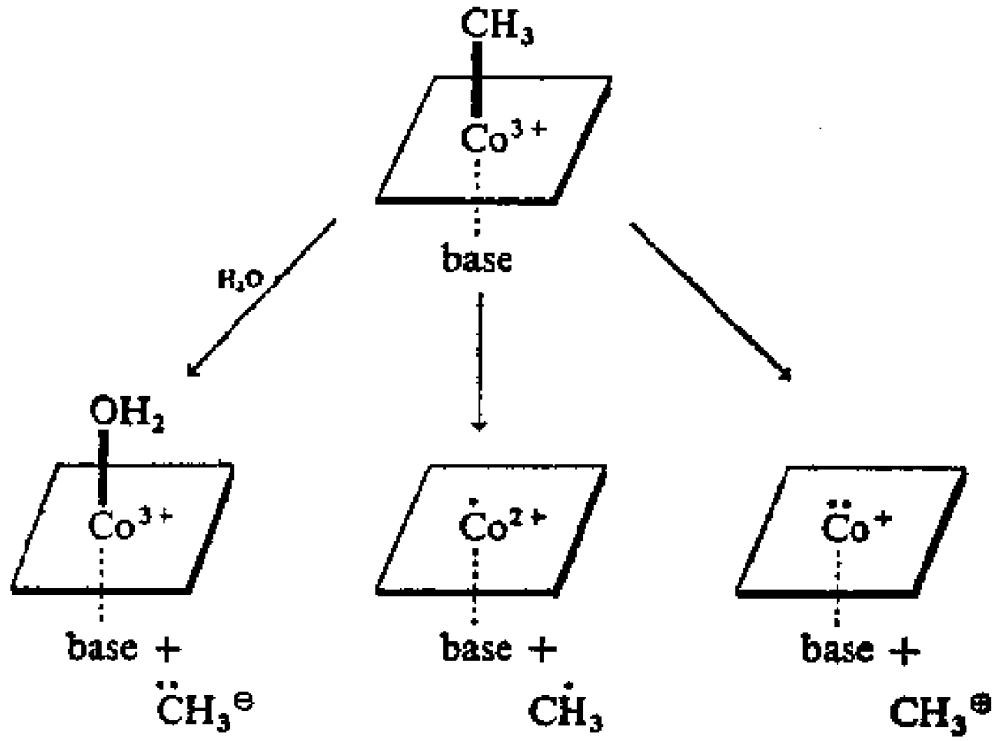
通过对辅酶B_{12}催化的生化反应广泛深入地研究，可以勾画出下面一幅图画。首先，辅酶B_{12}插入底物未活化的一个C—H键中。结果是辅酶的腺苷基携带上了一个底物的氢原子，而底物的亚甲基（在甲基丙二酸—CoA转化为琥珀酰—CoA情况中）取代了原先的腺苷—B_{12}的C—Co键而结合在B_{12}的钴原子上。第二步，在B_{12}-底物分子内部发生一个重排反应，产生一个B_{12}-产物分子。最后，发生相当第一步反应的可逆反应，再次形成B_{12}-钴键，携带着5′-脱氧腺苷甲基的一个氢原子的产物被释放出来。[46]

但是，对于自然界中辅酶B_{12}重排反应的碳自由基中间体机制目前还缺乏直接可信的证据，有关的工作正待进行。

7.5.4 自然界中的汞污染与VB_{12}的转甲基化作用

随着汞在环境中重要性的增加，对于它的甲基化和维生素B_{12}的关系，我们略作说明。Wood是第一位详细研究汞甲基化机制的人[47]。Wood的研究工作证实，甲基化汞的生物合成是在无氧的条件下进行的。历史地讲，早有人发现，在自然界中无机汞可被烷基化而成甲基汞离子，也就指点到对目前汞污染问题的重要性。汞离子是一个极强的甲基受体，单甲基化衍生物在水溶液中能稳定存在。水溶液中的甲基汞离子可以被单细胞生物吸收，从而进入水生的食物链中。沿着这条链，汞的浓度被逐渐积累起来，在鱼中达到高毒性的水平，这会强烈地影响到那些食鱼的生物。Wood认为依赖B12的酶系统在生物体内经过转甲基化

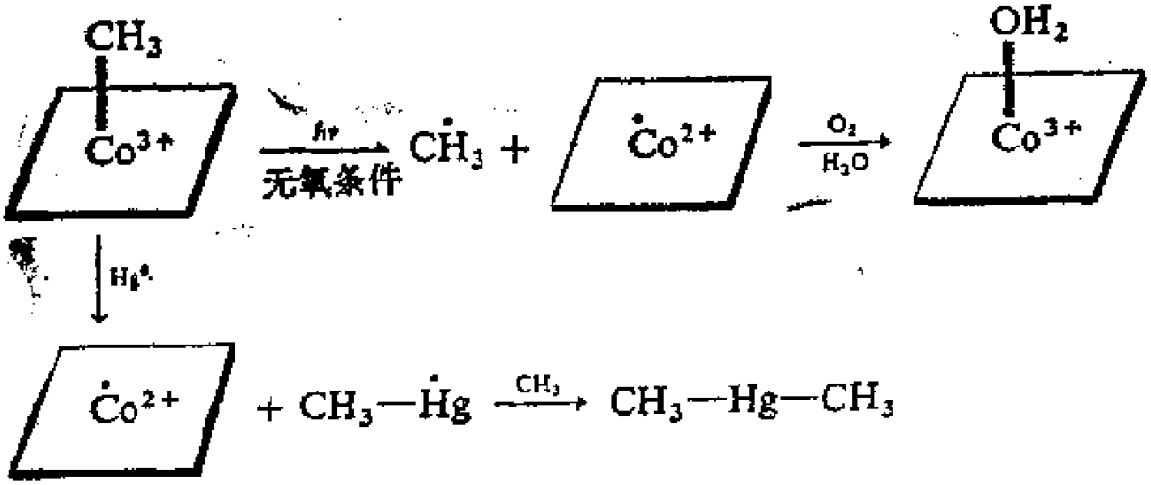
作用可以合成甲基汞。这涉及甲基从一个底物转到另一个底物中，常常作为生化反应的一部分。在自然界生物体系内，主要存在着三种参与转甲基反应的辅酶：S-腺苷甲硫氨酸（SAM），N^5-甲基四氢叶酸（$N^5—CH_3—THF$）和甲基咕啉衍生物（甲基钴胺素）。前两种包括碳正离子的甲基转移。Wood 认为第三种是尤其有效的甲基转移试剂，因为它们可以以甲基负离子、甲基正离子或甲基自由基的形式转移甲基。



涉及汞甲基化的酶有甲硫氨酸合成酶、乙酸合成酶和甲烷合成酶。最后一种是厌氧生态系统中最常见的酶。这些酶作用过程中可以产生 CH_3^+ 和 CH_3^-。在这些过程中维生素 B_{12} 的衍生物作为甲基化 Hg（Ⅱ）离子的传递者。

通过模型也显示，在厌氧条件下，当甲基咕啉被光解时，Co—C 键的均裂也能产生 Co（Ⅱ）和甲基自由基：

人们相信，二甲基汞的合成也是通过甲基自由基加到金属汞



上的。在某些生物中，Hg（Ⅱ）可以转运通过细胞膜，被还原成金属汞，然后被甲基化。易挥发的二甲基汞易于从微生物细胞中扩散出来，然后被释放入水中。如果在酸性pH条件下，它能被转化为单甲基汞和甲烷：

$$\begin{array}{l} CH_3—Hg—CH_3+H^+ \longrightarrow \underset{\text{可溶}}{CH_3Hg^+}+CH_4 \\ \quad \underset{\text{挥发}}{\downarrow h\nu} \\ C_2H_6+CH_4+Hg\ (0) \end{array}$$

显然，易挥发的甲基汞在大气中可以被光照降解为乙烷、甲烷和Hg(0)，然后金属汞又返回土壤和湖泊中，又开始了下一次“环境汞的循环”[48]。

维生素B_{12}和它的衍生物发挥了多种神奇的催化作用，参与了各种有机生物中的众多不寻常的生化转化过程。环境中汞的转化只是维生素B_{12}多种作用中的一个侧面而已。图7-12给出了其他生物活性的甲基受体、授体和维生素B_{12}之间联系的球形图。四氢叶酸辅助因子被当作“一碳单位”的载体，是由2-氨基-4-羟基喋啶核组成，常被称作喋呤。

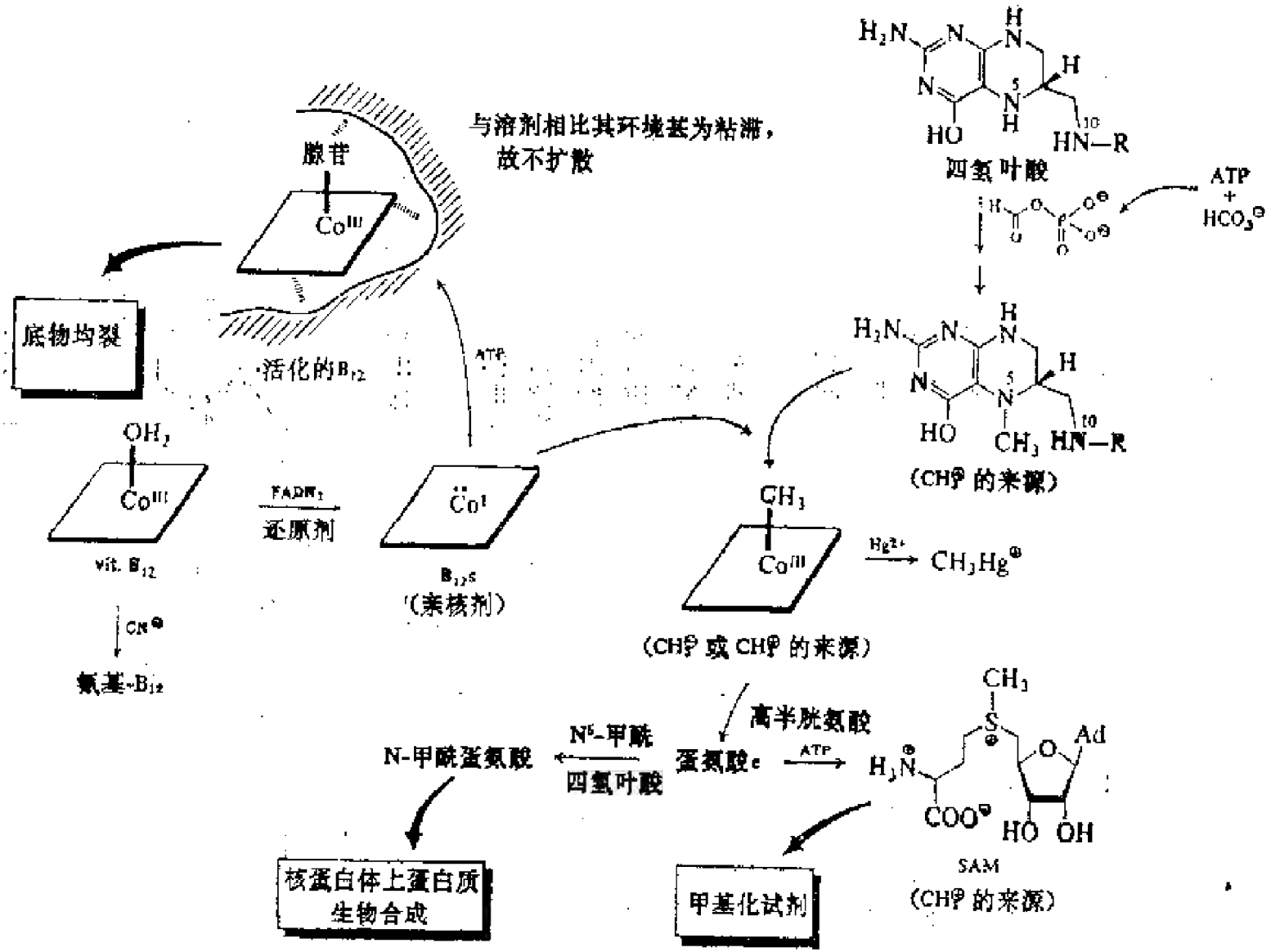


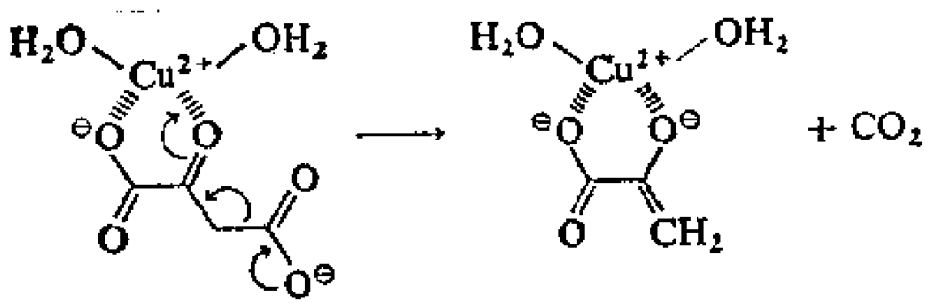
图7-12 维生素B_{12}酶生物学上其他甲基化反应的关系

7.6 氨基酸的酯、酰胺和肽的水解

通常，过渡金属仅拥有部分充满电子的 d 轨道。在溶液中，这些带正电荷的金属离子易与带负电荷的离子或其他小的具有给电子能力的化学基团（称为配体）形成络离子。配体-金属配合物的几何构型主要依赖于金属离子的性质，可以有四面体、平面正方形，三角双锥或八面体等类型。在评价过渡金属与配体形成的配合物时，必须考虑到以下两点：首先是配体-金属间形成的键的性质，其次是所形成的配合物的几何构型。通过这两个因素可以确定配合物的稳定性。

在许多金属离子催化的反应中，金属离子的角色常与质子类似，但要比一个质子更有效，因为金属离子可以带几个正电荷，所以水溶液中离子的浓度相对可以很高。由实验结果得知，在中性条件下，浓度可以达到0.1mol/L，而H^+只能达到10^{-7}mol/L。因为金属与底物形成的配合物要比游离的底物更稳定，所以整个过程就能量来说也是有利的。这是由于配合物的 ΔG 较低，在过渡态中的ΔG^{++}也较低的关系。

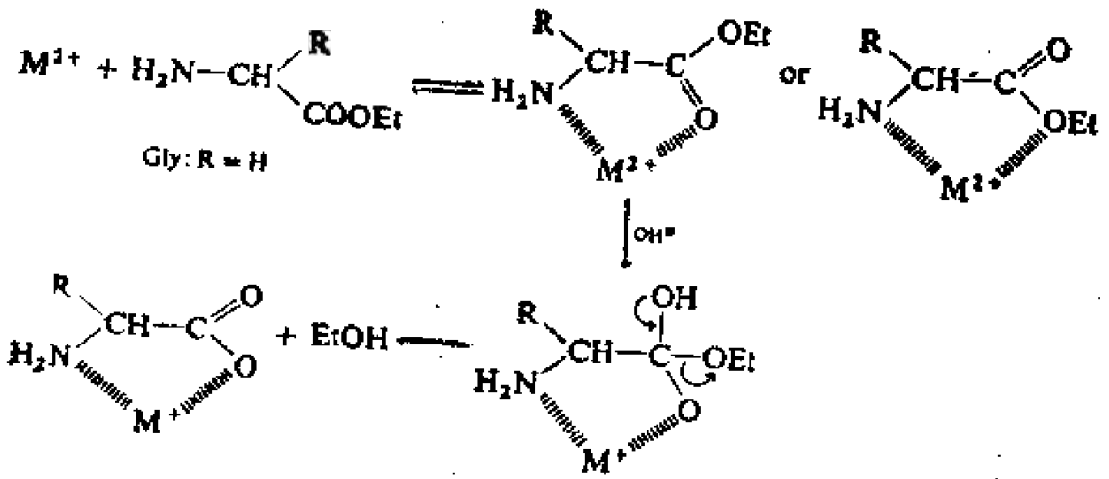
例如，当草酰乙酸与 Cu（Ⅱ）离子络合后，脱羧反应就容易进行：



金属离子可以与底物形成多个键，从而降低了底物的电子云密度，因而起到“超酸”的作用。另外，Fe（Ⅲ）是一个比 Fe（Ⅱ）更好的催化剂，这是由于正电荷多的缘故。

由于酶有一个很合适的三维空间结构，所以它将形成一个起催化作用的催化部位。可是，小肽只有较小的刚性，因而不具有催化能力，但是非常有趣的是，如果一个金属离子结合到肽上，可以发生酰胺键的水解，这类似于用水解酶所观察到的现象。酰胺(或酯)在多种金属离子催化下很容易发生水解，因为α-氨基和羰基的氧是两个非常容易与金属离子络合的配体。换句话说，由于带正电荷的金属离子具有较强的拉电子效应，使得配位后的配基（肽）获得了较高的反应性。

Co（Ⅱ）和 Cu（Ⅱ）离子在pH7到8、25℃时可以催化甘氨酸乙酯的水解，而在相同条件下，没有金属离子时它是稳定的。金属离子（M^{2+}）与氨基酸酯之间络合，可形成一个五元环的金属螯合物。伴随着金属离子与氨基酸的氨基和酯基的配位，产生了催化作用。在这两种情况下，金属离子可以极化羰基，从而有利于OH^-的进攻。水解速率随着pH增加而增加，说明了OH^-参与了水解的过程。从热力学上来讲，水解反应易于进行，可能是因为产物中的羧酸根负离子比原料酯更容易与金属离子络合。

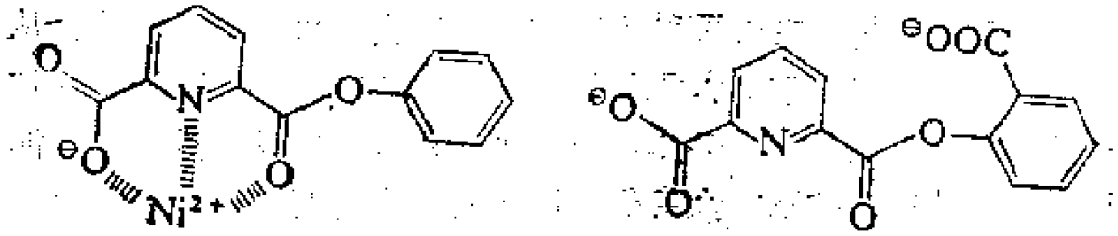


经过实验，人们发现普通的酯不被金属离子催化水解，只有当酯分子中除羰基以外还有一个与金属离子配位的位置时，金属

离子才能催化水解酯。如氨基酸酯就易被催化水解。

从热力学意义上来讲，由于电荷被稳定，在氨基酸水解过程中形成的金属-氨基酸配合物的过渡态的能量要比游离的过渡态低。在金属催化过程中，ΔS^{++} 中的溶剂重新有序项可能也较小。总之，在结合底物时，金属离子有一个较高的模板效应是很重要的。金属离子也可以催化许多酰胺的水解，但其效果比有适当键合点的酯要小得多。原因在于离去基团的性质有很大差异。不太易离去的酰胺基使得四面体中间体的裂解成为限速步骤。

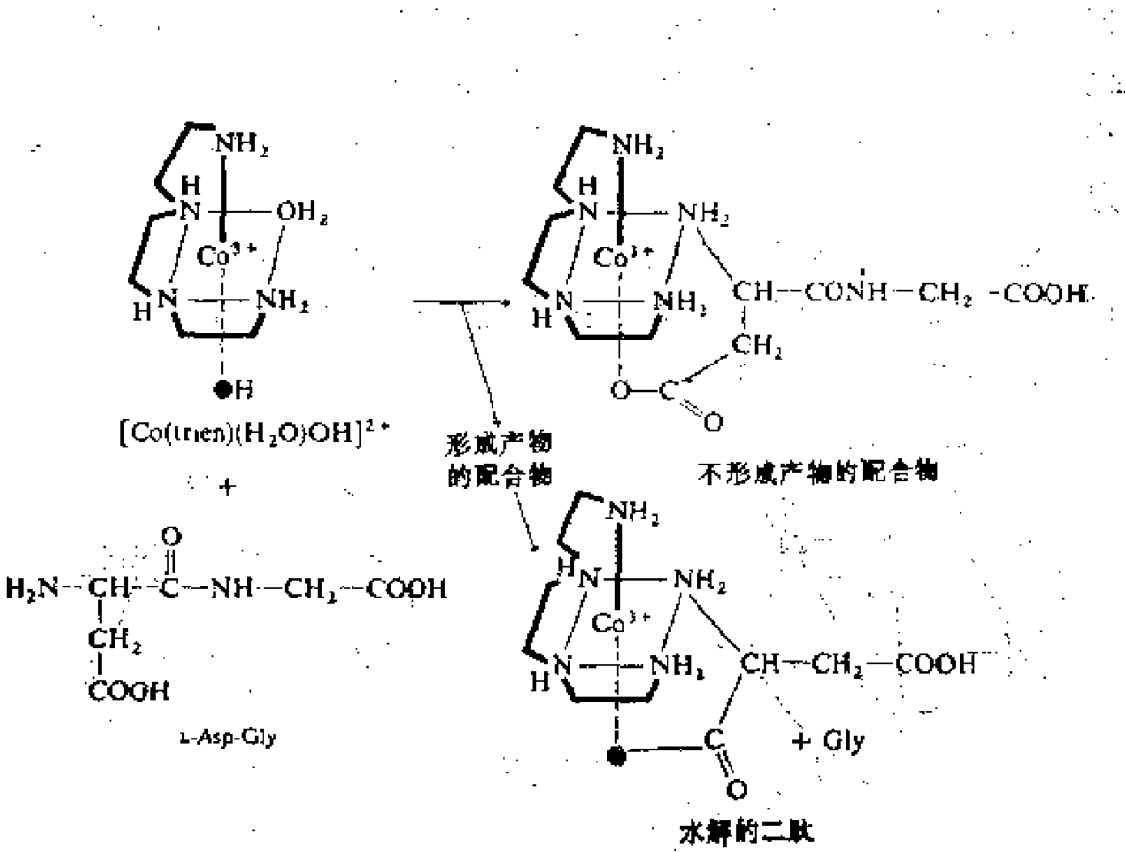
让我们看下面几个模型。对于吡啶-2,6-二羧酸的酚酯和水杨酸酯的水解，当与 Ni（Ⅱ）、Zn（Ⅱ）离子络合时，水解的速度大大增加了[49]。



与无Ni（Ⅱ）离子参与时相比，酚酯的相对速率增加 9300 倍，而水杨酸酚酯增加3100倍。

钴离子在酯或酰胺水解时，也能发挥重要的催化作用。例如，Co（Ⅲ）在极化肽键的羰基时比 Zn（Ⅱ）还要有效得多。可是据估计，羧肽酶A催化苯甲酰甘氨酰-L-苯丙氨酸水解要比 Co（Ⅲ）快10^4倍。因此，酶在催化时一定还有其他的功效。

Buckingham[50, 51]曾经制备了许多稳定的Co（Ⅲ）与氨基酸和肽的配合物。乙二胺和和三亚乙基四胺是常用的配体。利用络离子催化剂顺式-β-羟水合三亚乙基四胺合钴（Ⅲ），简写为 $[Co(trien)(H_2O)OH]^{2+}$，可催化二肽L—天门冬氨酰甘氨酸发生肽键水解，但这一水解反应只有当底物以恰当的方式结合时才会发生。

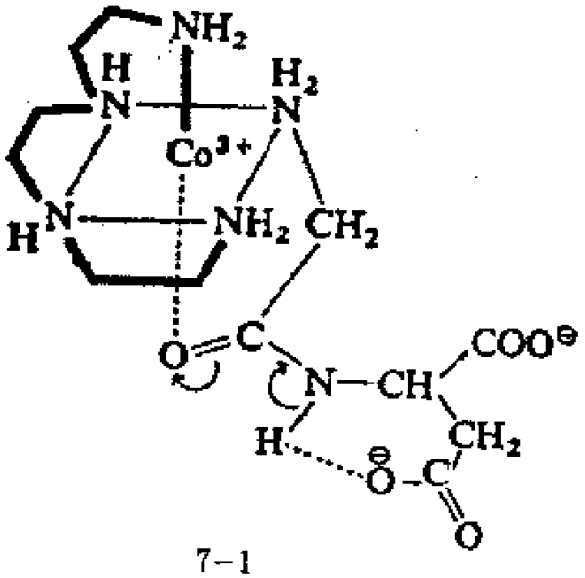


限速的第一步涉及到以肽的末端氨基取代配位的水分子。剩下的—OH配基作为亲核试剂促进水解。类似的配位的水分子或羟基的分子内进攻在配位化学中是常见的。

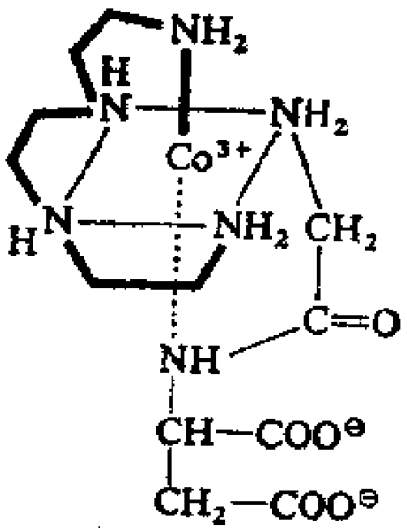
Co（Ⅲ）-trien系统的优点在于，在金属离子配位界面进行的水分子和取代物的交换进行得较慢（$t_{1/2}$≃数分钟或数小时）。这样，一些动力学参数可以很容易测到。配基在水溶液中缓慢交换有利于用^{18}O（以●表示）跟踪配位的水或羟基交换的过程，以便区分是直接亲核进攻还是一般碱途径的水解方式。这些优点，在考虑到与之平行的酶过程时，却也带来了显而易见的问题。例如，Co（Ⅲ）-trien 络离子促进的反应是化学计算的，而不是催化的。因为不论是水解还是水合的产物依旧牢牢地结合在金属中心上。基于这一点，Co(Ⅲ) 配合物不能用于酶的模拟。

但是由于与合适的配基络合时降低了ΔS^{++}（ΔH^{++}依然没变），仍能观察到速率增加了 10^4 倍。所以这一体系仍然较好地模拟了金属离子极化它相邻的底物分子并且活化配位的亲核基团的能力。

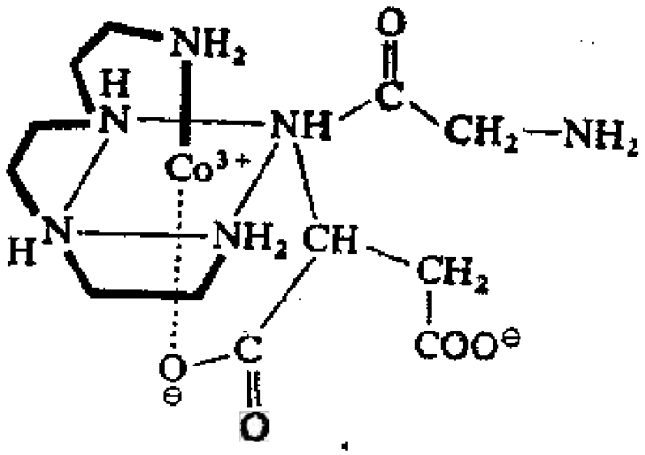
我们再来看另外一个例子：甘氨酰天门冬氨酸被 $[Co(trien\ H_2O)\ OH]^{2+}$ 水解的反应，这个反应比前面的例子稍复杂一些，因为可能存在下面三种结构：



7-1



7-2

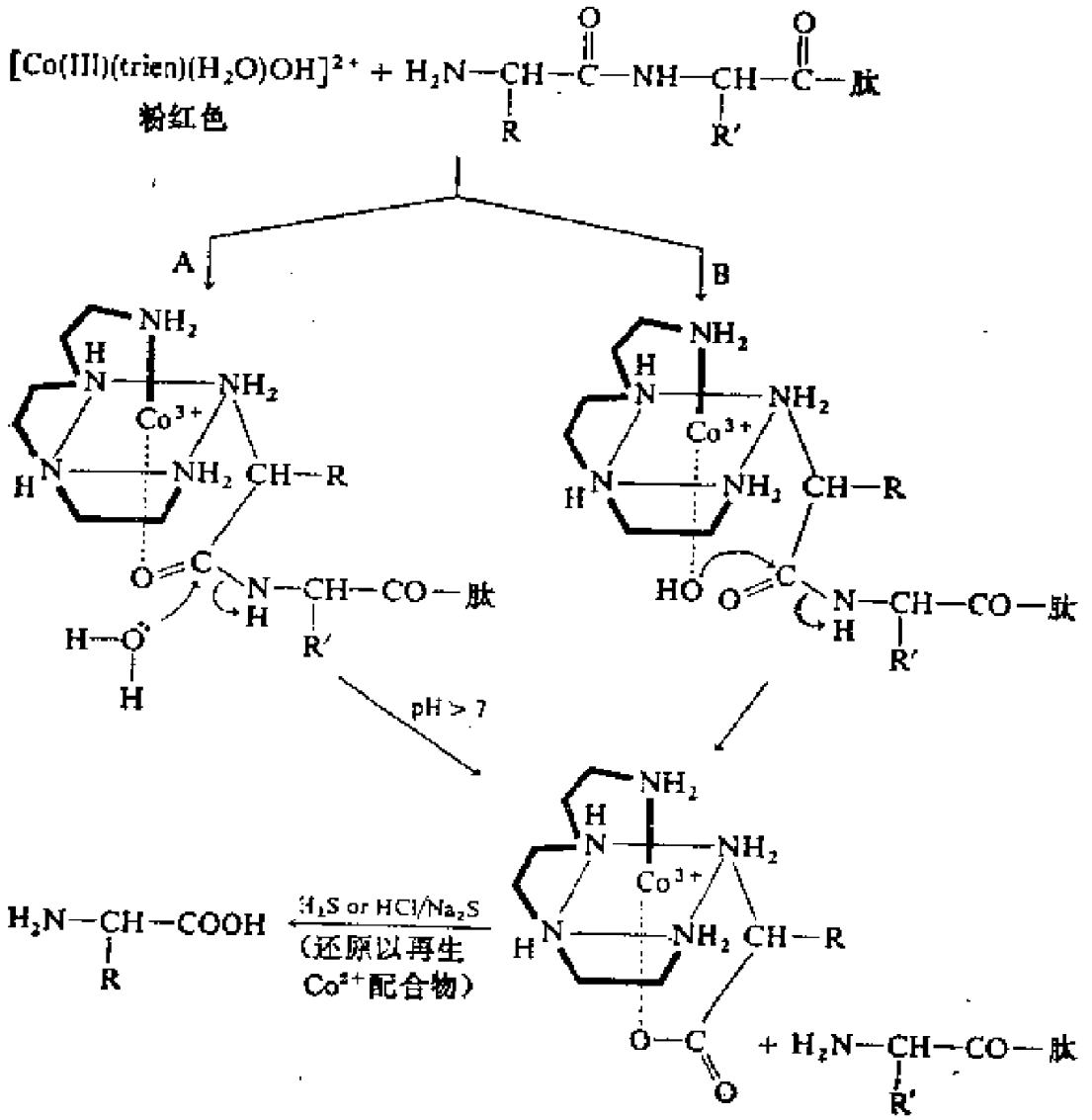


7-3

根据 NMR 和氢核氘核交换的研究表明，结构 7-1 是有利

的，水解收率为20%。这里，我们再次看到，N末端先与钴离子结合，随后酰胺键的羰基也与 Co^{3+} 络合。天冬氨酸的γ-羧酸根可能通过稳定配合物参与水解反应。

一般来说，对于不含极性侧链的肽，其金属-底物配合物的水解可能有两种方式。一种是先形成末端氨基和酰胺羰基的配位中间体，然后由外部的水分子进攻酰胺的羰基。另一种是由相邻配位的羟基作为一个亲核试剂进攻酰胺。这个过程相当于金属-配

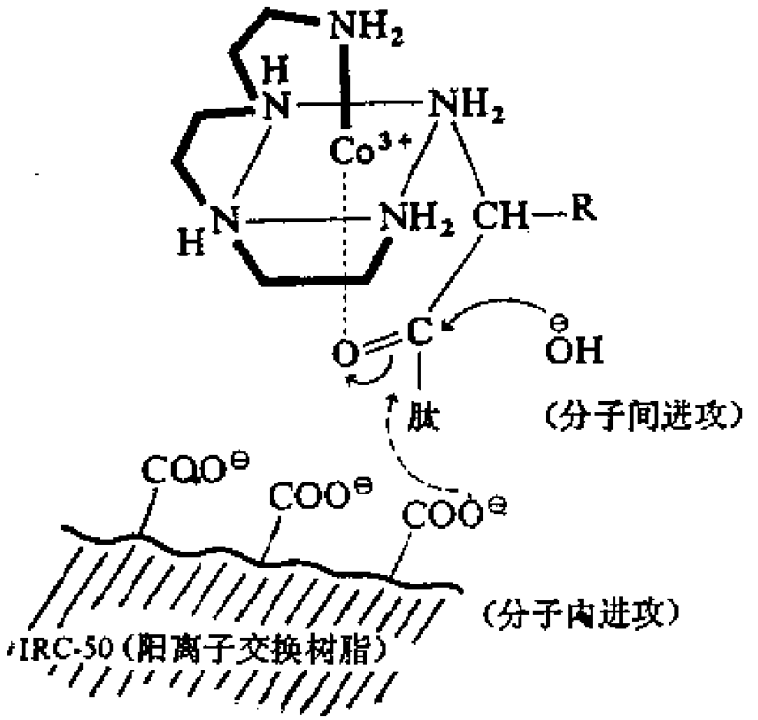


体配合物催化的分子内水解。这些方式可以利用富^{18}O的水来跟踪检测。

这是一个非常有意义的情况。因为它只选择性地水解肽链N末端的氨基酸。产生的Co（Ⅲ）-氨基酸配合物可以被还原剂分解。但我们应该认识到，在水解过程中金属离子并未起到真正催化剂的作用，因为它必须经过再生。它在水解过程中更多的是起着促进剂的作用。利用这种Co(Ⅲ）配合物水解酰胺，要比用碱快10^8倍。这种对水解反应的加速作用可以与羧肽酶A相媲美。

还要注意到，在与Co（Ⅲ）结合时，过程A之所以比过程B更有利是因为被极化的羰基要比没有络合的形式更容易受到外部水分子的进攻。在此，金属离子再次扮演了超酸的角色。换句话说，在被金属离子直接极化的碳原子上产生了一个更加亲电的中心。当然，不同的金属离子此能力的大小各不相同，这主要取决于它们总的电荷、体积大小、配位数和配位的水分子被取代的难易。

上述反应已被用于肽的N末端逐步按次序水解和序列分析。



这一作用类似于氨肽酶。对于大多数氨基酸来说，水解产率在30%至50%之间。为了提高产率，人们已选择了包括固相载体在内的一些方法。在60℃的碱性缓冲溶液中，只有N-末端残基依然键合在树脂载体上，同时未反应的原料可以被洗下，以备再用[52]（见上页图）。

总之，金属离子通过两种必要的方式使得水解反应或其他试剂的亲核置换反应易于进行：直接极化底物以利外部进攻，或者产生(通过离子化)一个非常活泼的(碱性)试剂。不论在哪个生物体系中，金属离子的一个重要功能是，在生物体系可接受的 pH 条件下，提供一个较强的亲核试剂和一个有效的反应浓度。

7.7 硒与生物体的关系[58, 60]

元素硒是在 1818 年由 Berzelius 发现的。它同时具有金属性和非金属性。与生物体有关的硒的价态有四种：Se^{-2}，Se^{0}，Se^{+4}，Se^{+6}。虽然硒的化学性质类似于硫，但生物体系倾向于还原硒的化合物而对硫则是氧化硫的化合物。

在 1957 年，人们首次发现硒与动物有密切的关系。从此硒——作为动物体必须的微量元素，引起了人们极大的兴趣。目前，人们已经了解到硒是动物和许多细菌中的谷胱甘肽还原酶[53]和过氧化物酶（GSH—Px）的一个组分。D. Chin 和 L. Tapped等人在 1977 年利用X-射线光电子光谱研究谷胱甘肽过氧化物酶时，观察到了硒 3d-电子的信号[54]。另外，钼酶的(molybdoenzyme) 甲酸脱氢酶中也含有硒[55]。GSH—Px的分子量大约80 000 道尔顿，它含有四个亚单位。每摩尔的 GSH—Px 约含4个克原子的硒，此酶存在于肝细胞的细胞质和线粒体的基质中，它可以保护组织免受H_2O_2或有机氢过氧化物的过氧化。

由于体内硒的缺乏可以引起许多疾病，例如，肝坏死、黄疸、水肿、小动脉壁的透明化、精子形态异常、骨骼肌和心肌的

变性。在我国东北克山地区流行的一种心肌病——克山病，就是由于地区性缺硒引起的。当体内硒水平过低时，谷胱甘肽过氧化物酶就处于一种较低的水平，由于它不能及时清除体内的过氧化物，从而使过氧化物氧化了细胞膜的脂类和含硫氨基酸，最终导致细胞的坏死。

有些生长在富硒的土壤区的植物具有富集硒的作用。家畜吃了这些高硒的植物以后，就会引起急性硒中毒 blind stagger，引起神经系统紊乱和食欲不振。

在动物体内，硒化物的降解产生一种具有浓烈大蒜气味的物质——二甲基硒。人们已弄清了这一反应的机理。Se（Ⅳ）（H_2SeO_3）与谷胱甘肽反应得到一个含—SSeS—的物质，这种物质经过谷胱甘肽硒化过硫化物（glutathioneselenopersulphide）中间体，被酶还原成H_2Se。最后以S—腺苷甲硫氨酸作为甲基授体，H_2Se甲基化产生二甲基硒[56]。

$$H_2SeO_3+4GSH\longrightarrow GSSeSG+GSSG+3H_2O$$

$$GSSeSG+NADPH+H^+\xrightarrow[\text{还原酶}]{GSH}GSSeH+GSH+NADP$$

$$GSSeH+NADPH+H^+\longrightarrow H_2Se+GSH+NADP$$

$$H_2Se\longrightarrow Me_2Se+Me_3Se^+$$

对于硒可以防止汞中毒的作用人们已较熟悉了。在防止汞中毒时，硒似乎可以把汞从它产生毒性的部位移开，而将汞固定在另外的地方。解毒的原理可能体现了硒与汞对这些位置的竞争作用。另外，硒还可以防止软金属（如镉化物）[58]引起的中毒。

此外在吃含高水平的硒食物与低癌症死亡率之间似乎存在着某种联系。这是一个非常复杂的领域，还有待于做更深入的研究[57]。

张　东

参考文献

第 2 章

1. F. Lipmann. Nonribosomal polypeptide synthesis on polyenzyme templates. Acc Chem Res 1973; 6:361.
2. J.A. Walder, R.Y. Walder, M.J. Heller, S. M. Freier, R.L. Letsinger, and I.M. Klotz. Complementary carrier peptide synthesis: General strategy and implications for prebiotic origin of peptide synthesis. Proc Nat Acad Sci USA 1979; 76:51.
3. J. Hughes, T.W. Smith, H. N. Kosterlitz, L. A. Forthergill, and B.A. Morgan. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature 1975; 258:577.
4. B.P. Roques, C. Garbay-Jaureguiberry, R. Oberlin, M. Anteunis, and A.K. Lala. Conformation of Met^5-enkephalin determined by high field PMR spectroscopy. Nature. 1976; 262: 778.
5. C. Garbay-Jaureguiberry, D. Marion, E. Fellion, and B.P. Roqaes Refinement of conformational frequencies of Leu enkephalin and Tyr-Gly-Phe by ^{15}N-NMR. Int. J. Pet. Protein Res 1982; 20:443.
6. I.L. Karle, J. Karle, D. Mastropaolo, A. Camerman, and N. Camerman. (Leu^5) enkephalin; Four cocrystallizing conformers with extended backbones that form an antiparallel β-

sheet, Acta Crystallogr. 1983; Sect.B 39:625.

7. P.W.Schiller and J.Di Maio. Opiate receptor subclasses differ in their conformational requirements.Nature, 1982; 297:74.

8. P.W.Schiller In, R.S. Rapaka, G.Barnett, and R.L.Hawks, Eds., Opioid Peptides:Medicinal Chemisty, UIDA Research Monograph, 1986; 69:291.

9 K.E.Neet and D.E. Koshland The conversion of serine at the active site of subtilisin to cysteine a "chemical mutation." Proc Natl Acad Sec USA 1966; 56:1606.

10. L.Polgar and M.L.Bender A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin.J. Amer.Chem. Soc. 1966; 88:3153.

11. P. I. Clark and G. Lowe Conversion of the active-site cysteine residue of papain into a dihydro-serine, a serine and a glycine residue.Eur.J.Biochem. 1978; 84:293.

12. R. Baum, Enzyme research advances protein engineering. Chem.Eng.News.Oct. 1986; 13:23.

13. J. A. Gerlt Relationships between enzymatic catalysis and active site structure revealed by applications of site-directed mutagenesis.Chem.Rev. 1987; 87:1079.

14. D. S. Lawrence and E. T. Kaiser, Chemical mutation of enzyme active sites. Science 1984; 226:505.

15. J. T. Slama, S. R. Oruganti, and E.T.Kaiser Semisynthetic enzymes: Synthesis of a new flavopapain with high catalytic efficiency.J.Amer Chem Soc 1981; 103:6211

16. H. Zemel, A new semisynthetic esterase. J Amer Chem Soc 1987; 109:1875.

17. J.H. Parish and M. J. McPherson. Chemical and biochemical manipulation of DNA and the expression of foreign genes in micro-organisms.Natural Prod Rep 1987; 4:139.

18. M.J.McPherson and J.H.Parish.Applications of recombinant DNA in biotechnology.Natural Prod Rep 1987; 4:205.

第 3 章

1. W. A. Blattler and J. R. Knowles. Stereochemical course of phosphokinases. The use of adenosine (γ-(S)-^{16}O, ^{17}O, ^{18}O) triphosphate and the mechanistic consequences for the reactions catalyzed by glycerol kinase, hexokinase, pyruvate kinase and acetate kinase. Biochemistry 1979; 18:3927.
2. W. A. Blattler and J. R. Knowles. The stereochemical course of glycerol kinase-phosphoryl transfer from chiral (γ-(S)-^{16}O, ^{17}O, ^{18}O) ATP, J. Amer. Chem. Soc 1979; 101:510.
3. G. Lowe, G. Tansley, and P. M. Cullis. Synthesis of adenosine 5′ ((R)-α-^{17}O) triphosphate. J. Chem Soc Chem Commun 1932; 595
4. D. Seebach, R. Imwinkelried and T. Weber. in R. Scheffold, Ed., Modern Synthetic Methods. Springer-Verlag, Berlin. (1986).
5. D. A. Evans T. C. Britton, R. L. Dorow and J. F. Dellaria. Stereoselective aminatin of chiral enolates. Anew approch to the asymmetric synthesis of α-amino and derivatives. J Amer Chem Soc. 1986; 108:6395.
6. Yoon S. Cho-Chung et al. Role of site-selective cAMP analogs in the control and reversal of malignancy. Pharmac Ther. 1991; 50:1.
7. R. Singleton, Jr., Bioorganic chemistry of phosphorous. J. Chem Educ. 1973; 50:538.
8. F. H. Westheimer. Pseudo-rotation in the hydrolysis of phosphate esters. Acc Chem Res 1968; 1:70.
9. C. A. Deakyne and L. C. Allen. Role of active-site residues in the catalytic mechanism of ribonuclease A. J Amer Chem Soc. 1979; 101:3951.

10. D.A.Usher and D.I. Richardson Jr. Absoluts stereochemistry of the second step of ribonulease action. Nature 1970; 228:663.

11. D.A.Usher, E.S.Erenrich, and F.Eckstein.Geometry of the first step in the action of ribonuclease A. Proc Nat Acad Sci USA 1972; 69:115.

12. F. Eckstein. Phosphorothioate analogues of nucleotides.Tools for the investigation of biological processes. Angew Chem Int Engl Ed. 1983; 22:423.

13. P. A. Frey. Stereochemistry of enzymatic reactions of phosphates.Tetrahedron 1982; 38:1547.

14. K. T. Douglas. Anticancer drugs, DNA as a target.Chem & Ind 1984; 738.

15. K.T.Douglas. Anticancer drugs, DNA-intercalation and free radical attack.Chem & Ind 1984; 736.

16. B.E. Bowler, L. S. Hollis, and S. J.Lippard. Synthesis of DNA binding and photomimicking properties of acridine orange linked by a polymethylene ether to (1, 2-diaminoethane) dichloroplatinum (II).J Amer.Chem Soc 1984; 106: 6102.

17. J.W.Lown and C.C. Haustock Structure and function of the antitumor antibiotic carzinophilin A:The first natural intercalative bisalkylator.J Amer Chem Soc 1982; 104:3213.

18. A.H.J. Wang, G.Ughetto, G. J. Quigley, T.Hakoshima, G. A.van der Marel,J.H.van Boom, and A.Rich.The molecular structure of a DNA-triostin A complex.Science 1984; 225: 1115.

19. D. Leon, C.Garbay-Jaureguiberry, J. B. LePecq, and B. P. Roques.A new and improved synthesis of a potential antitumor 7H-pyrido (4, 3-c) carbazole analog. Tetrahedron Lett 1985; 26:4929.

20. G. J. Atwell, G.M.Stewart, W. Leupin, and W.A.Denny.A

diacridine derivative that binds by bisintercalation at two contiguous sites on DNA. J. Amer Chem Soc 1985; 107:4335.

21. G. J. Atwell, B. C. Baguley, D. Wilmanska, and W. A. Denny. Potential antitumor agents. 45. Synthesis, DNA-binding intercalation and biological activity of triacridine derivatives. J. Med Chem 1986; 29:69.

22. J. W. Lown. Newer approaches to the study of the mechanisms of action of antitumor antibiotics. Acc Chem Res 1982; 15:381.

23. P. B. Dervan and M. M. Becker. Molecular recognition of DNA by small molecules. Synthesis of bis(methidium) spermine, a DNA polyintercalating molecule. J Amer Chem Soc 1968; 100:1968.

24. R. P. Hertzberg and P. B. Dervan. Cleavage of double helical DNA by (methidium-EDTA) iron (II). J Amer Chem Soc 1982; 104:313.

25. J. Stubbe and J. W. Kozarich. Mechanisms of bleomycin-induced DNA degradation. Chem Rev 1987; 87:1107.

26. P. G. Schultz, J. S. Taylor, and P. B. Dervan. Design and synthesis of a sequence-specific DNA cleaving molecule. (Distamycin-EDTA) iron (II). J Amer Chem Soc 1982; 100: 6861.

27. M. W. van Dykes, R. P. Hertzberg, and P. B. Dervan. Map of distamycin, netropsin, and actinomycin binding sites on heterogeous DNA : DNA cleavage-inhibition patterns with methidiumpropyl-EDTA. Fe (II). Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79:5470.

28. J. H. Griffin and P. B. Dervan. Metalloregulation in the sequence specific binding of synthetic molecules to DNA. J Amer Chem Soc 1987; 109:6840.

29. W. A. Saffran, J. Goldenberg, and C. R. Cantor. Site-directed psoralen crosslinking of DNA. Proc. Natl Acad. Sci USA

1982; 79:4694.

30. G.D.Cimino, H.B.Gamper, S.T. Isaacs, and J.E. Hearst, Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: Organic chemistry, photochemistry and biochemistry, Ann Rev Biochem 1985; 54:1151.

31. A. Basak and H. Dugas, Design and synthesis of DNA intercalating crown ether molecules, Tetrahedron Lett 1986; 27:3.

32. R.L. Letsinger and M.S. Schott. Selectivity in binding a phenanthridinium-dinucleotide derivative to homopolynucleotides, J Amer Chem Soc 1981; 103:7394.

33. 张礼和. 核酸性酶的发现赢得了1989年诺贝尔化学奖, 大学化学, 1990; 5(3):2.

34. 金由辛等, RNA的催化功能—1989年诺贝尔化学奖获得者工作简介。生命的化学, 1990; 10(3):32.

35. T.R. Cech and B L. Bass. Biological catalysis by RNA. Ann Rev Biochem 1986; 55:599.

36. N.R. Pace and T. L. Marsh, RNA catalysis and the origin of life, Origins of Life 1985; 16:97.

37. R. Cedergren, B.F. Lang, and D. Gravel, A mechanism for the RNA-catalyzed formation of 5′-phosphates: The origin of nucleases, FEBS Lett 1987; 226:63.

38. T. R. Cech. The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes. Science 1987; 236:1532.

39 G. M. McCorkle and S. Altman, RNA's as catalysts, J Chem Educ 1987; 64:221.

40. 陈松东. 很有希望的酶RNA设计. 生命的化学, 1990; 10(3): 38.

41. 熊克勇. "剪切基因" ～一种高效精密的基因武器. 生命的化学, 1991, 11(1):10.

第 4 章

1. T.C.Bruice and V. K. Pandit, The effect of general substitution ring size and rotamer distribution on the intramolecular nucleophilic catalysis of the hydrolysis of monophenyl esters of dibasic acids and the solvolysis of the intermediate anhydrides, J Amer Chem Soc 1963; 85:5858.
2. W.P.Jencks, Binding energy, specificity, and enzymic catalysis : The circle effect, Adv Enzymol 1975; 43:219.
3. C.G.Swain and J.F.Brown, Concerted displacement reactions. VII. The mechanism of acid base catalysis in non-aqueous solvents, J. Amer Chem Soc 1952; 74:2534.
4. T.Higuchi, H.Takechi, I.H. Pitman, and H.L. Fung, Intramolecular bifunctional facilitation in complex molecules, combined nucleophilic and general acid participation in hydrolysis of hexachlorophene monosuccinate, J Amer Chem Soc 1971; 93:539.
5. B.A.Cunningham and G.L.Schmir, Iminolactones. II. Catalytic effects on the nature of the products of hydrolysis, J Amer Chem Soc 1966; 88:551.
6. Y.N. Lee and G. L. Schmir, Concurrent general acid and general base catalysis in the hydrolysis of an amide ester. I. Monofunctional catalysis, J Amer Chem Soc 1978; 100:6700.
7. Y.N.Lee and G. L. Schmir, Concurrent general acid and general base catalysis in the hydrolysis of an imidate ester. 2. Bifunctional catalysis, J Amer Chem Soc 1979; 101:3026.
8. D. M. Blow, Structure and mechanism of chymotrypsin, Acc Chem Res 1976; 9:145.
9. D.M.Blow, J.J.Birktoft, and B. S.Hartley, Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin, Na-

ture. 1969; 221:337.

10. P.B.Sigler, D.M.Blow, B.W.Matthews, and R.Henderson, Structure of crystalline α-chymotrypsin II. A preliminary report including a hypothesis for the activation mechanism. J Mol Biol 1968; 35:143.

11. H.T.Wright, Activation of chymotrypsinogen-A. An hypothesis based upon comparison of the crystal structures of chymotrypsinogen-A and α-chymotrypsin. J Mol Biol 1973; 79: 13.

12. M.W.Hunkapiller, M. D. Forgac, and J.H.Richards, Mechanism of action of serine proteases: Tetrahedral intermediate and concerted proton transfer. Biochemistry 1976; 15:5581.

13. H.Kaplan, V.B.Symonds, H. Dugas, and D.R. Whitaker, A comparison of properties of α-lytic protease of Sorangium sp. and porcine elastase. Can J Chem 1970; 47:649.

14. J. L. Markley and I. B. Ibanez, Zymogen activation in serine proteinases. Proton magnetic resonance pH titration studies of the two histidines of bovine chymotrypsinogen A and chymotrypsin Aα. Biochemistry 1978; 17:4527.

15. G. Robillard and R. G. Shulman, High resolution nuclear magnetic resonance study of the histidine-aspartate hydrogen bond in chymotrypsin and chymotrypsinogen. J. Mol Biol 1972; 71:507.

16. M.A.Porubcan, W.M.Westler, I.B.Ibanez, and J.L.Markley, (Diisopropylphosphoryl) serine proteinases. Proton on phosphorus-31 nuclear magnetic resonance-pH titration studies. Biochemistry 1979; 18:4108.

17. G.A.Rogers and T.C.Bruice, Isolation of a tetrahedral intermediate in an acetyl transfer reaction. J. Amer Chem Soc 1973; 95:4452.

18. G.A.Rogers and T.C.Bruice, Control of modes of intramolecular imidazole catalysis of ester hydrolysis by steric and

electronic effects. J. Amer Chem Soc 1974; 96:2463.

19. G.A. Rogers and T. C. Bruice, Synthesis and evaluation of a model for the so-called "charge-relay" system of the serine esterases. J Amer Chem Soc 1974; 96:2473.

20. G.A. Rogers and T. C. Bruice, The mechanisms of acyl group transfer from a tetrahedral intermediate. J. Amer Chem Soc 1974; 96:2481.

21. M. Komiyama and M. L. Bender, General base-catalyzed ester hydrolysis as a model of the "charge-relay" system. Bioorg Chem. 1977; 6:13.

22. L. D. Byers and D. E. Koshland, Jr., On the mechanism of action of methyl chymotrypsin. Bioorg Chem 1978; 7: 15.

23. G.E. Hein an C. Niemann, Steric course and specificity of α-chymotrypsin-catalyzed reactions. I. J. Amer Chem Soc 1962; 84:4487.

24. G. E. Hein and C. Niemann, Steric course and specificity of α-chymotrypsin-catalyzed reactions. II. J. Amer Chem Soc. 1962; 84:4495.

25. M. S. Silver and T. Sone, Stereospecificity in the hydrolysis of conformationally homogeneous substrates by α-chymotrypsin. J. Amer. Chem Soc 1968; 90:6193.

26. S. G. Cohen and R. M. Schultz, The active site of α-chymotrypsin. J. Mol. Biol. 1968; 243:2607.

27. D. C. Phillips, The hen egg-white lysozyme molecule. Proc Nat Acad Sci 1967; USA 57:484.

28. B. Capon and M. C. Smith, Intramolecular catalysis in acetal hydrolysis. Chem Comm 1965; 523.

29. P. Deslongchamps, Stereoelectronic control in the cleavage of tetrahedral intermediates in the hydrolysis of esters and amides. Tetrahedron 1975; 31:2463.

30. P. Deslongchamps, Stereoelectronic control in hydrolytic rea-

ctions,26th IUPAC,Tokyo, Japan,1977.

31. P.Deslongchamps, Stereolectronic Effects in Organic Chemisty,1983; Pergamon Press, Oxford.

32. S.A.Bizzozero and B.O.Zweifel, The importance of the conformation of the tetrahedral intermediate for the α-chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of peptide substrates,FEBS Lett, 1975; 59:105.

33. W. L. Mock, Torsional-strain considerations in enzymology. Some applications to proteases and ensuing mechanistic consequences,Bioorg Chem 1976; 5:403.

34. C. H. Wong and G. M. Whitesides, Synthesis of sugars by aldolasecatalzed condensation reactions,J.Org Chem 1983; 48:3199.

35. W.E.Ladner and G. M. Whitesides,Lipase-catalyzed hydrolysis as a route to esters of chiral epoxy alcohols, J. Amer Chem Soc 1984; 106:7250.

36. Y.F.Wang, C.S.Chen, G. Girdaukas, and C. J. Sih,Bifunctional chiral synthons via biochemical methods,3,Optical purity enhancement in enzymatic asymmetric catalysis,J Amer, Chem Soc 1984; 106:3695.

37. G. Sabbioni and J. B. Jones Enzyme in organic synthesis. 39. Preparation of chiral cyclic acid-ester and bicyclic lactones via stereoselective pig liver esterase catalyzed hydrolyses of cyclic meso diesters,J.Org Chem 1987; 52:4565.

38. H.M. Colquhoun, J.F. Stodart, and D. J. Williams, Second sphere coordination—a novel role for molecular receptors. Angew Chem Int Ed Engl. 1986; 25:487

39. A.R. Fersht and A. J. Kirby, Intramoleclar Catalysis and the mechanism of enzyme action,Chem Br. 1980; 16:136.

40. D.J.Cram,Molecular cells, their guests, portals, and behavior,Chem Tech 1987; 120.

41. P.A. Bartlett and C. R. Johnson. An inhibitor of chorismate

mutase resembling the transition-state conformation, 1985; J Amer Chem Soc 107, 7792-7793.

42. S.J.Lippard.The bioinorganic chemistry of rust.Chem Britain 1986; 222.

43. A.Akiyama, M.Bednarski, M.J.Kim, E.S. Simon, H.Waldmann, and G. M. Whitesides. Enzymes in organic synthesis. Chem Britain 1987; 645.

44. D.G. Gorenstein (1987), Stereoelectronic effects in biomolecules.Chem Rev 1987; 87:1047.

45. K. M. Shokat et al. A new strategy for the generation of catalytic antibodies.Nature 1989. 338:269.

46. R. A. Lerner et al.At the crossroads of chemistry and immunology:Catalytic antibodies. Science 1991; 252:659.

第5章

1. D.J.Cram and J.M.Cram.Host-guest chemistry.Science 1974; 183:803.

2. D.J.Cram et al. Host-guest complexation.1.Concept and illustration.J.Amer Chem Soc. 1977; 99:2564.

3. A. Warshawsky, R. Kalir, A. Deshe, H. Berkovitz, and A. Patchornik. Polymeric pseudocrown ethers. 1. Syuthesis and complexation with transition metal anions. J.Amer Chem Soc. 1979; 101:4249.

4. S. Hanessian. Approaches to the total synthesis of natural products using "chiral templates" derived from carbohydrates.Acc Chem Res 1979; 12:159.

5. Y.Murakami, Y.Aoyama, M.Kada, and J.I.Kikuchi.Macrocyclic enzyme model system: Catalysis of ester degradation by a [20] paracyclophane bearing nucleophilic and metal-binding sites. Chem Commun 1978; 494.

6. J.P. Kintzinger, J.-M. Lehn, E.Kauffmann, J. L. Dye, and A. I. Popov, Anion coordination chemistry, ^{35}Cl-NMR studies of chloride anion cryptates. J. Amer Chem Soc 1983; 105: 7549.

7. J.-M. Lehn and C.Sirlin. Molecular catalysis: Enhnced rate of thiolysis with high structural and chiral recognition in complexes of a reactive receptor molecule. Chem Commun, 1978; 949

8. F. Vogtle and E. Weber, Multidentate acyclic neutral ligands and their complexation, Angew Chem. Int Ed Engl, 1979; 18: 753.

9. C.M. Deber and E. R. Blout, Amino acid-cyclic peptide complexes of chemisry J.Amer Chem Soc, 1974; 96:7566.

10. J.P.Behr, C.J. Burrows, R.Heng, and J.-M. Lehn. Synthesis of novel macrobicyclic polyfunctional cryptands. Tetrahedron Lett 1985; 26:215.

11. J.P.Kintzinger, F. Kotzyba-Hibert, J.-M.Lehn, A.Pagelot, and K. Saigo. Dynamic properties of molecular complexes and receptor-substrate complementarity. Molecular dynamics of macrotricyclic diammonium cryptates. Chem Commun, 1981; 883

12. A. D. Hamilton, J.-M.Lehn, and J. L. Sessler, Coreceptor molecules. Synthesis of metalloreceptors contining porphyrin subunits and formation of mixed substrate supermolecules by binding of organic substrates and metal ions. J. Amer Chem Soc 1986; 108:5158.

13. M.Dhaenens, L.Lacombe, J. -M. Lehn, and J. P. Vigneron. Binding of acetylcholine and other molecular cations by a macrocyclic receptor molecule of speleand type. Chem Commun 1984; 1097.

14. F.P. Schmidtchen. Probing the design of a novel ditopic anion receptor. J. Amer Chem Soc 1986; 108:8249.

15. P.G. Yoharmes, M. P.Mertes, and K.B. Mertes. Pyrophospha-

te formation via a phosphoramidate intermediate in polyammonium macrocycle/metal ion-catalyzed hydrolysis of ATP. J.Amer.Chem Soc 1985; 107:8288.

16. B.D.White, K.A. Arnold, and G. W. Gokel.One- and two-armed lariat ether peptide derivatives: Synthesis and cation binding properties.Tetrahedron Lett 1987; 28:1749.

17. B.D.White, F.R.Fronczek, R.D.Gandour, and G.W.Gokel. Molecular structures of 4, 13-diaza-18-crown-6 derivatives having glycine-glycine sidearms: two potassium iodide complexes.Tetrahedron Lett 1987; 18:1753.

18. R.A.Schultz, D.M.Dishong, and G.W.Gokel, Lariat ethers. 4.Chain length and ring size effects in macrocyclic polyethers having neutral donor groups on flexible arms. J Amer Chem Soc 1982; 104:625.

19. T.W.Robinson and R.A.Bartsch.Sidearm participation in crown phosphonate monoethylalkali metal cation complexes.Chem Commun 1985; 990.

20. M.Kim and G. W. Gokel.A molecular box, based on bibracchial lariat ether having adenine and thymine sidearms, that self-assembles in water.Chem Commun 1987; 1656.

21. C.A.Chang, J.Twu, and R. A. Bartsch. pH-Dependent metal ion selectivity by a crown ether carboxylic acid.Inorg Chem. 1986; 25:396.

22. R.A.Bartsch, B.P.Czech, S.I.Kang, L.E.Stewart, W.Walkowiak, W.A. Charewicz, G. S. Heo, and B. Son. High lithium selectivity in competitive alkali-metal solvent extracton by lipophilic crown carboxylic acids.J Amer Chem Soc 1985; 107:4997.

23. K.Kimora, H.Sakamoto,S.Kitzzawa, and T.Shono. Novel lithiumselective ionophore, bearing an easily ionizable moiety. Chem Commun. 1985; 669.

24. J.K.Beadle, D.M.Dishong, Khama, R. K. and G.W.Gokel.

Synthesis and proprties of arenediazonium and anilinium cation lariat ether complexes:An "ostrich molecule" complex and evidence for intramolecular sidearm-macroring interaction. Tetrahedron 1984; 40:3935.

25. H. Dugas, P. Brunet, and J. Desroches. Design and synthesis of a novel bis-crown ether carrier molecule mimic of (Na^+, K^+)-ATP ase. Tetrahedron Lett 1986; 27:7.

26. S. Shinkai, T. Nakaji, T. Ogawa, K. J. Shigematsu, and O. Manabe. Photoresponsible crown ethers. 2. Photocontrol of ion extraction and ion transport by a bis (crown ether) with a butterfly-like motion. J Amer Chem Soc 1981; 103:111.

27. D. J. Cram. Cavitands: Organic host with enforced cavities. Science 1983; 219:1177.

28. C.D. Gutsche. Calixarenes. Acc Chem Res. 1983; 16:161.

29. D.J. Cram and P. Y. S. Lam. Host-guest complexation. 37. Syntheses and binding properties of transacylase partial mimic with imidazole and benzyl alcohol in place. Tetrahedron 1986; 42:1607.

30. D. J. Cram and H.E. Katz. An incremental approach to hosts that mimic serine proteases. J Amer Chem Soc, 1983; 105:135

31. Y. Murakami, Y. Aoyama, and M. Kida. Macrocyclic enzyme models. A metallo [10.10] paracyclophane bearing two imidazolyl groups as an efficient, bifunctional catalyst for ester hydrolysis. J Chem Soc Perkin II 1980; 1665.

32. I. Takahashi, k. Odashima, and K. Koga. Diastereomeric host-guest complex formation by an optically active paracyclophane in water. Tetrahedron Lett. 1984; 25:973.

33. R. Dharanipragada and F. Diederich. Diastereomeric complex formation between a novel optically active host and naproxen in aqueous solution. Tetrahedron Lett 1987; 28:2443.

34. F. M. Menger. M. Takeshita, and J. F. Chow. Hexapus, a new complexing agent for organic molecules. J Amer Chem Soc

1981; 103:5938.

35. F.H.Kohnke, A.M.Z. Slawin, J.F. Stoddart, and D.J.Williams.Molecular belts and collars in the making: A hexaepoxyoctacosahydro [12] cyclocene derivative. Angew Chem Ed Engl 1987; 26:892.

36. J.L.Dye.Electride.Sc Amer Sept 1987; pp.66.

37. C. A. Bunton.Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry.In: Techniques of Chemistry Series (J.B.Jones, C. J. Sih, and D. Peciman, Eds.), 1976, vol. 10, Part II, Chap.4, pp.731 Wiley-Interscience, New York.

38. J. R. Escabi-Perez and J. H. Fendler. Ultrafast excited state proton transfer in reversed micelles. J. Amer Chem Soc 1978; 100:2234.

39. W. Tagaki and H. Hara. Acyloin condensation of aldehydes catalyzed by N-laurylthiazolium bromide.Chem Comm 1973; 891.

40. J.M.Brown and C. A.Bunton.Stereoselective micelle-promoted ester hydrolysis.Chem Comm 1974; 969.

41. P. Lauger.Mechanisms of biological ion transport-carriers, channels, and pumps in artificial lipid membranes.Angew Chem Int Ed Engl, 1985; 24:905-923.

42. J. H. Fendler. Membrane mimic chemistry. Chem in Britain 1984; 1098-1103.

43. J.M.Dolfino, C.J.Stankovic, S. L. Schreider, and F.M.Richards.Synthesis of a bipolar phosphatidylethanolamine:A model compound for a membrane-spanning probe. Tetrahedron Lett 1987; 28:2323-2326.

44. T. S. Arrhenius, M. Blanchard-Desce, M.Drolaitzky, J.-M. Lehn, and J. Malthete. Molecular devices:Caroviologens as an approach to molecular wires—Synthesis and incorporation into vesicle membranes. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 5355-5359.

45. P.Luthi and P.L. Luisi, Enzymatic synthesis of hydrocarbon-soluble peptides with reverse micelles. J Amer Chem Soc 1984; 106:7285.

46. C. G. Overberger and J. C. Salamone. Esterolytic action of synthetic macromolecules, Acc Chem Res 1969; 2:217

47. R. Breslow and P. Campbell. Selective aromatic substitution within a cyclodextrin mixed complex. J Amer Chem Soc 1969; 91:3085.

48. M. Komiyama, E. J. Breaux, and M. L. Bender. The use of cycloamylose to probe the "charge-relay" system. Bioorg Chem 1977; 6:127.

49. J. Emert and R. Breslow. Modification of the cavity of β-cyclodextrin by flexible capping. J. Amer Chem Soc. 1975; 67:670.

50. R.Breslow, J.B.Doherty, G.Guillot, and C.Lipsey. β-Cyclodextrinyl-bismidazole, a model for ribonuclease. J Amer Chem Soc 1978; 100:3227

51. R.Breslow and L.E.Overman. An "artificial enzyme" combining a metal catalytic group and a hydrophobic binding cavity. J Amer Chem Soc 1970; 92:1075.

52. a. J.Boger, D.G.Brenner, and J.R.Knowles. Symmetrical triaminoper-O-methyl-α-cyclodextrin: Preparation and characterization of primary trisubstituted α-cyclodextrins. J Amer Chem Soc 1979; 101:7630.

b. J.Boger and J.R.Knowles. Symmetrical tramino-per-O-methyl-α-cyclodextrin: A host for phosphate esters exploiting both hydrophobic and electrostatic interactions in aqueous solution. J Amer Chem Soc 1979; 101:7631.

53. R.Breslow, M.Hammond, and M.Lauer. Selective transamination and optical induction by a β-cyclodextrin-pyridoxamine artificial enzyme. J Amer Chem Soc 1980; 102:421.

54. N.Saenger, M.Noltemeyer, P.C.Manor, B.Hingerty, and E.B.

Klar, "Induced-fit" -type complex formation of the model enzyme α-cyclodextrin, Bioorg Chem 1972; 5:187.

55. I. Tabushi, Y. Kuroda, and K. Shimokawa. Cyclodextrin having an amino group as a rhodopsin model. J Amer Chem Soc 1979; 101:4759

56. I. Tabushi, K. Yamamura, K. Fujita, and H. Kawakubo. Specific inclusion catalysis by β-cyclodextrin in the one-step preparation of vitamin K_1 or K_2 analogues. J Amer Chem Soc 1979; 101:1019.

57. D. D. Sternbach and D. M. Rossana. Cyclodextrin catalysis in the intramolecular Diels-Alder reaction with the furan diene. J. Amer Chem Soc 1982; 104:5853.

58. R. Breslow, P. Bovy, and C. L. Hersch. Reversing the selectivity of cyclodextrin bisimidazole ribonuclease mimics by changing the catalyst geometry. J Amer Chem Soc 1980; 102:2115.

59. I. Tabushi, Y. Kuroda, K. Yokota, and L. C. Yuan. Regiospecific A, C-and A, D-disulfonate capping of β-cyclodextrin. J. Amer Chem Soc 1981; 103:711.

60. I. Tabushi, Y. Kuroda, and T. Mizutani. Artificial receptors for amino acid in water. Local environmental effect on polar recognition by 6A-amino-6B-carboxy- and 6B-amino-6A-carboxy-β-cyclodextrins. J Amer Chem Soc 1986; 108:4514.

61. J. P. Guthrie. Application of Biochemical Systems in Organic Chemistry. In: Techniques of Chemistry Series (J. B. Jones, C. J. Sih, and D. Perlman, Eds.). 1976; Vol. 10, Part II, Chap. 3. pp. 627 Wiley-Interscience, New York.

62. R. Breslow and M. A. Winnick. Remote oxidation of unactivated methylene groups. J Amer Chem Soc 1969; 91: 3083.

63. R. Breslow, J. Rothbard, F Herman, and M. L. Rodriguez. Remote functionalization reactions as conformational probes for flexible alkyl chains. J Amer Chem Soc 1978; 100:1213.

64. M. F. Czarniecki and R. Breslow. Photochemical probes for model membrane structues. JAmer Chem Soc 1979; 101 3675.

65. R. Breslow, R. J. Corcoran, and B. B. Snider. Remote functionalization of steroids by a radical relay mechanism. J Amer Chem Soc 1974; 96:6791.

66. R. Breslow, B. B. Snider, and R. J. Corcoran. A cortisone synthesis using remote oxidation. J Amer Chem Soc 1974; 96:6792.

67. M. A. Schwartz and I. S. Mami A biologically patterned synthesis of the morphine alkaloids. J Amer Chem Soc 1975; 97:1239.

68. K.C.Nicolaou, G.P. Gasic, and W. E. Barrette.Synthesis and biological properties of prostaglandin endoperoxides, thromboxanes and prostacyclins. Angew Chem Int Ed Engl 1978; 17:293.

69. M.O.Funk, R.Isaac, and N.A.Porter.Free radical cyclization of unsaturated hydroperoxides. J Amer Chem Soc 1975; 97: 1281.

70. E. E. van Tamelen. Bioorganic chemistry, Total synthesis of tetra-and pentacyclic triterpenoids.Acc Chem Res 1975; 8:152

71. W.S. Johnson Biomimetic Polyene Cyclizations. Bioorg Chem 1976; 5:51.

72. E.J.Corey, W.E.Russey, and P.R.Ortiz de Montellano.2,3-Oxidosqualene, an intermediate in the biological synthesis ot sterols from squalene.J Amer Chem Soc 1966; 88:4750

73. R.K.Mandogal, T.T. Tchen, and K.Bloch.1, 2-Methyl shifts in the cyclization of squalene to lanosterol. J Amer Chem Soc 1958; 80:2589-2590.

74. W.S.Johnson, S.J.Telfer, S.Cheng, and U.Schubert.Cation-stabilizing auxiliaries: A new concept in biomimetic polyene cyclization.J Amer Chem Soc 1987; 109:2517.

75. E.E. van Tamelen, E. J. Leopold, S. A. Marson, and H.R. Waespe. Action of 2, 3-oxidosqualene lanosterol cyclase on 15'-nor-18, 19-dihydro-2, 3-oxidosqualene. J Amer Chem Soc 1982; 104:6479.

第6章

1. D.J. Creighton and D.S. Sigman. A model for alcohol dehydrogenase. The zinc ion catalyzed reduction of 1,10-phenanthroline -2-carbox aldehyde by N-propyl-1,4-dihydronicotinamide. J Amer Chem Soc 1971; 93:6314

2. U. Grau, H. Kapmeyer, and W.E. Trommer. Combined coenzyme-substrate analogues of various dehydrogenases. Synthesis of (3S)- and (3R)-5-(3-carboxy-3-hydroxypropyl) nicotinamide adenine dinucleotide and their interaction with (S)- and (R)-lactate-specific dehydrogenases. Biochemistry 1978; 17:4621

3. J.T. van Bergen and R.M. Kellogg. A crown ether NAD(P)H mimic. Complexation with cations and enhanced hydride donating ability toward sulfonium salts. J Amer Chem Soc 1977; 99:3882

4. J.P. Behr and J.-M. Lehn. Enhanced rates of dihydrophridine to pyridinium hydrogen transfer in complexes of an active macrocyclic receptor molecule. Chem Comm 1978; 143

5. M. Kojima, F. Toda, and K. Hattori. β-Cyclodextrin-nicotinamide as a model for NADH dependent enzymes. J Chem Soc Perkin I 1981; 1647

6. B.O. Soderberg, O. Tapia, and C.I. Branden. Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution. J Mol Biol 1976; 102:27

7. G.A. Hamilton, In, Progress in Bioorganic Chemistry (E.T.

Kaiser and T.J. Kezdy, Eds.), Vol. 1, pp. 83-137. Wiley-Interscience. New York. 1971

8. A.J. Irwin and J.B. Jones. Stereoselective horse liver alcohol dehydrogenase catalyzed oxidoreductions of some bicyclic [2.2.1] and [3.2.1] ketones and alcohols. J Amer Chem Soc 1976; 98:8476

9. A.J. Irwin and J.B. Jones. Regiospecific and enantioselective horse liver alcohol dehydrogenase catalyzed oxidations of some hydroxycyclopentanes. J Amer Chem Soc 1977; 99:1625

10. J.B. Jones and J.F. Beck. Application of Biochemical Systems in Organic Chemistry. In, Techniques of Chemistry Series (J.B. Jones, C.J. Sih, and D. Perlman, Eds.), Part I, pp. 107-401. Wiley, New York 1976

11. J.B. Jones and J.J. Jakovac. A new cubic-space section model for predicting the specificity of horse liver alcohol dehydrogenase-catalyzed oxidoreductions. Can J Chem 1982; 60:19

12. D.J. Creighton, J. Hajdu, G. Mooser, and D.S. Sigman. Model dehydrogenase reactions. Reduction of N-methylacridinium ion by reduced nicotinamide adenine dinucleotide and its derivatives. J. Amer. Chem. Soc. 1973; 95-6855

13. P. Hemmerich, V. Massey, and G. Weber. Photo-induced benzyl substitution of flavins by phenylacetate, A possible model for flavoprotein catalysis. Nature 1967; 213:728

14. M. Brüstlein and T.C. Bruice. Demonstration of a direct hydrogen transfer between NADH and a deazaflavin. J Amer Chem Soc 1972; 94:6548

15. W.H. Rastetter, T.R. Gadek, J.P. Tane, and J.W. Frost Oxidations and oxygen transfer effected by a flavin N(5)-oxide, A model for flavin-dependent monooxygenases. J Amer Chem Soc 1979; 101:2228

16. H.W. Orf and D. Dolphin. Oxaziridines as possible intermedia-

tes in flavin monooxygenases. Proc Nat Acad Sci USA 1974; 71:2646

17. D.M. Jerina, J.W. Daly, B. Witkop, S. Zaltzman-Nirenberg, and S. Udenfriend. 1,2-Naphthalene oxide as an intermediate in the microsomal hydroxylation of naphthalene. Biochemistry 1969; 9:147

18. J.L. Fox. Chemists attack complex organic mechanisms. Chem Eng News May 22, pp. 28-30. 1978

19. B.P. Branchaud and C.T. Walsh. Functional group diversity in enzymatic oxygenation reactions catalyzed by bacterial flavin-containing cyclohexanone oxygenase. J Amer Chem Soc 1985; 107:2153

20. J.N. Lowe and L.L. Ingraham. An Introduction to Biochemical REactions Mechanisms, Chap. 3. Foundation of Molecular Biology Series. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. (1974)

21. G. Schoellmann and E. Shaw. Direct evidence for the presence of histidine in the active center of chymotrypsin. Biochemistry 1963; 2:252

22. R.R. Rando. Mechanisms of action of naturally occurring irreversible enzyme inhibitors. Acc Chem Res 1975; 8:281

23. C. Walsh. Chemical approaches to the study of enzymes catalyzing redox transformations. Annu Rev Biochem 1978; 47:881

24. M.J. Jung and B.W. Metcalf. Catalytic inhibition of γ-aminobutyric acid α-ketoglutarate transaminase of bacterial origin by 4-aminohex-5-ynoic acid, a substrate analog. Biochem Res Commun 1975; 67:301

25. P. Fasella and R. John. Substrate analogues as specific inhibitors of pyridoxal-dependent enzymes. Proc 4th Int Congr Pharmacol 1969; 5:184

26. Y. Morino and M. Okamoto. Labeling of the active site of cytoplasmic aspartate amino transferase by β-chloro-L-ala-

nine, Biochem Biophys Res Commun 1973; 50:1061

27. R. Breslow, On the mechanism of thiamine action, IV, Evidence from studies on model systems, J Amer Chem Soc 1958; 80: 3719

28. A.E. Metzler, Biochemistry, The Chemical Reactions of Living Cells, Chap 8, Academic Press, New York 1977

29. A.A. Gallo and H.Z. Sable, Coenzyme interactions, VIII ^{13}C-NMR studies of thiamine and related compounds, J Biol Chem 1974; 249:1382

30. J.Moss and M.D. Lane, The biotin-dependent enzymes, Adv Enzymol 1971; 35:321

31. R. Kluger and P.D. Adawadkar, A reaction proceeding through intramolecular phosphorylation of a urea, A chemical mechanism for enzymic carboxylation of biotin involving cleavage of ATP, J Amer Chem Soc 1976; 98:3741

32. W.C. Stallings, The carboxylation of biotin, Substrate recognition and activation by complementary hydrogen bonding, Arch Biochem Biophys 1977; 183:179

33. H.G. Wood, The reactive group of biotin catalysis by biotin enzymes, Trends Biochem Sci 1976; 1:4

34. F. Lynen, J. Knappe, E. Lorch, G. Jutting, and E. Ringelmann, Die biochemische Funktion des Biotins, Angew Chem 1959; 71:481

35. T.C. Bruice and A.F. Hegarty, Biotin-bound CO_2 and the mechanism of enzymatic carboxylation reactions, Proc Nat Acad Sci USA 1970; 65:805

36. C.M. Visser and R.M. Kellogg, Mimesis of the biotin mediated carboxyl transfer reactions, Bioorg Chem 1977; 6:79

37. D. Arigoni, F. Lynen, and J. Retey, Stereochemie der enzymatischen Carboxylierung von(2R)-2-^{3}H-Propionly-CoA, Helv Chim Acta 1966; 49:311

38. J. Retey and F. Lynen, Zur biochemischen Funktion des Biotins,

IX. Der sterische Verlauf der Carboxylierung von Propionyl-CoA. Biochem Z 1965; 342:256.

39. I.A. Rose, E.L. O'Connell, and F. Solomon. Intermolecular tritium transfer in the transcarboxylase reaction. J Biol Chem 1976; 251:902

40. J. Stubbe and R.H. Abeles. Biotin carboxylations concerted or not concerted? That is the question; J Biol Chem 1979; 252:8338

41. S.J. O'Keefe and J.R. Knowles. Enzymatic biotin-mediated carboxylation is not a concerted process. J Amer Chem Soc 1986; 108:328

第7章

1. B.L. Vallee and R.J.P. Williams. Enzyme action; Views derived from metalloenzyme studies. Chem Br 1968; 4:397

2. M. M. Jones and T.H. Pratt. Therapeutic chelating agents. J Chem Educ 1976; 53:342

3. E.W. Ainscough and A.M. Brodie The role of metal ions in proteins and other biological molecules. J Chem Educ 1976; 53:156

4. C.C. Tang, D. Davalian, P. Huand, and R. Breslow. Models of metal binding sites in zinc enzymes. Synthesis of tris [4 (5)-imidazolyl] carbinol (4-TIC), tris (2-imidazolyl)-carbinol (2-TIC), and related ligands and studies on metal complex binding constants and spectra. J Amer Chem Soc 1978; 100: 3918

5. P. Woolley. Models for metal ion function and evolution of the catalytic step in carbonic anhydrase, In; Biophysics and Physiology of Carbon Dioxide (C. Bauer, G. Gros, and H. Bartels, Eds.), Springer-Verlag, Berlin. 1980; 216

6. F.A. Quiocho and W.N. Lispcomb, Carboxypeptidase A, A protein and an enzyme. Adv Prot Chem 1971; 25:1
7. S.J. Gardell, C.S. Craik, D. Hilvert, M.S. Urdea, and W.J. Rutter. Site-directed mutagenesis shows that tyrosine 248 of carboxypeptidase A does not play a crucial role in catalysis. Nature 1985; 317:551
8. R. Breslow, D.E. McClure, R.S. Brown, and J. Elsenach. Very fast zinc catalyzed hydrolysis of an anhydride. A model for the rate and mechanism of carboxypeptidase A catalysis. J Amer Chem Soc 1975; 97:194
9. R. Breslow and D.E. McClure. Cooperative catalysis of the cleavage of an amide by carboxylate and phenolic groups in a carboxypeptidase A model. J Amer Chem Soc 1976; 98:258
10. R. Breslow and A. Schepartz. On the mechanism of peptide cleavage by carboxypeptidase A and related enzymes. Chem Lett (Japan) 1987; 1-4
11. T.H. Fife and V.L. Squillacote. Metal ion effects on intramolecular nucleophilic carboxyl group participation in amide and ester hydrolysis. Hydrolysis of N-(8-quinolyl)phthalamic acid and 8-quinolyl hydrogen glutarate. J Amer Chem Soc 1978; 100:4787
12. M.W. Makinen, L.C. Kuo, J.J. Dymouski, and S. Jaffer. Catalytic role of the metal ion of carboxypeptidase A in ester hydrolysis. J Biol Chem 1979; 254:356
13. F. Friden. Non-covalent interactions. J Chem Educ 1975; 52:754
14. E.F. Epstein, I. Bernal, and A.L. Balch. Activation of molecular oxygen by a metal complex. The formation and structure of the anion $[Ph_3POFe(S_2C_2(CF_3)_2)_2]^{\ominus}$. Chem Comm 1970; 136
15. J. Almog, J.E. Baldwin, R.I. Dyer, and M. Peters. Condensation of tetraaldehydes with pyrrole. Direct synthesis of "capped"

prophyrins. J Amer Chem Soc 1975; 97:226

16. J. Almog, J.E. Baldwin, and J. Huff. Reversible oxygenation and autooxidation of a "capped" porphyrin iron(Ⅱ) complex. J Amer Chem Soc 1975; 97:227

17. S.J. Lippard. The bioinorganic chemistry of rust. Chem Britain 1986; 222

18. T.G. Traylor, D. Campbell, S. Tsuchiya. Cyclophane porphyrin. 2. Models for steric hindrance to CO ligation in hemoproteins. J Amer Chem Soc 1979; 101:4748

19. E. Bayer and G. Holzbach. Synthetic homopolymers for reversible binding of molecular oxygen. Angew Chem Int Ed Engl 1977; 16:117

20. J.P. Collman Synthetic models for the oxygen-binding hemoproteins. Acc Chem Res 1977; 10:265

21. J.P. Collman, J.L. Brauman, E. Rose, and K.S. Suslick. Cooperativity in O_2 binding to iron porphyrins. Proc Nat Acad Sci USA 1978; 75:1052

22. R. Malkin. Iron-Sulfur Proteins, Vol. Ⅰ, Academic Press, New York.

23. (a)R.H. Holm. Synthetic approaches to the active sites of iron-sulfur proteins. Acc Chem Res 1977; 10:427
(b)R.H. Holm. Metal-centered oxygen atom transfer reactions. Acc Chem Res 1987; 87:1401

24. J.A. Ibers and R.H. Holm. Modeling coordination sites in metallobiomolecules, Science 1980; 209:223

25. S.J. Lippard. Oxo-bridged polyion centers in biological chemistry. Angew Chem Int Engl Ed 1988; 27:344

26. W.H. Rastetter, T.J. Erickson, and M.C. Venuti. Synthesis of iron chelators. Enterobactin, enantioenterobactin, and a chiral analogue. J Org Chem 1981; 46:3579

27. V.L. Pecoraro, F.L. Weitl, and K.N. Raymond. Ferric ion-specific sequestering agents. 7. Synthesis, iron-exchange kine-

tics, and stability constants of N-substituted, sulfonated catechoylamide analogues of enterobactin. J Amer Chem Soc 1981; 103:5133

28. P. Stutte, W. Kiggen, and F. Vogtle. Large molecular cavities bearing siderophore type functions. Tetrahedron 1987; 43:2065

29. F P. Guengerich and T.L. MacDonald. Chemical mechanisms of catalysis by cytochromes P-450: A unified view. Acc. Chem Res. 1984; 17:9

30. J.P. Collman and S.E. Groh. "Mercaptan-tail" porphyrins, Synthetic analogues for the active site of cytochrome P-450. J Amer Chem Soc 1982; 104:1391

31. A.R. Battersby, W. Howson, and A.D. Hamilton. Model studies on the active site of cytochrome P-450; An Fe(Ⅱ)-porphyrin carrying a strapped thiolate ligand. J Chem Soc Chem Commun 1982; 1266

32. J.I. Stesune and D. Dolphin. Organometallic aspects of cytochrome P-450 metabolism. Can J Chem 1987; 65:459

33. J.P. Collman, J.I. Brauman,B. Meunier, and S.A. Raybuck. Epoxidation of olefins by cytochrome P-450 model compounds: Mechanism of oxygen atom transfer. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81:3245

34. I. Tabushi and K. Morimitsu. Stereospecific, regioselective, and catalytic monoepoxidation of polyolefins by the use of a P-450 model, H_2-O_2-TPP-Mn-colloidal platinum. J Amer Chem Soc 1984; 106:6871

35. R.H. Abeles and D. Dolphin. The vitamin B_{12} coenzyme Acc Chem Res 1974; 9:114

36. J. Retey, A. Ulmani-Ronchi,J. Seibl, and D. Arigoni. Zum mechanismus der Propandioldehydrase-Reaktion. Experentia 1966; 22:502

37. R.B. Silverman and D. Dolphin. A direct method for cobalt-

carbon bond formation in cobalt(Ⅰ)-containing cobalamins and cobaloximes. Further support for cobalt(Ⅰ) π-complexes in coenzyme B_{12} dependent rearrangements. J Amer Chem Soc 1973; 95:1686

38. R.B. Silverman and D. Dolphin. Reaction of vinyl ethers with cobalamins and cobaloximes. J Amer Chem Soc 1974; 96:7094

39. R.B. Silverman, D. Dolphin, T.J. Carty, E.K. Krodel, and R.H. Abeles. Formylmethylcobalamin. J Amer Chem Soc 1974; 96:7096

40. G.N. Schrauzer. Organocobalt chemistry of vitamin B_{12} model compounds(cobaloximes). Acc Chem Res 1968; 1:97

41. G.N. Schrauzer.New developments in the field of vitamin B_{12}: Reactions of the cobalt atom in corrins and in vitamin B_{12} model compounds. Angew Chem Int Ed Engl 1976; 15:417

42. G.N. Schrauzer. New developments in the field of vitamin B_{12}:Enzymatic reactions dependent upon corrins and coenzyme B_{12}. Angew Chem Int Ed Engl 1977; 16:233

43. P. Dowd, B.K. Trivedi, M. Shapiro, and L.K. Marwaha. Vitamin B_{12} model studies. Migration of the acrylate fragment in the carbon-skeleton rearrangement leading to α-methylene-glutaric acid. J Amer Chem Soc 1976; 98:7875

44. T. Toraya, E. Krodel, A.S. Mildran, and R.H. Abeles. Role of peripheral side chains of vitamin B_{12} coenzymes in the reaction catalyzed by dioldehydrase. Biochemistry 1979; 18:417

45. J.Halpern, S.H.Kim and T.W. Leung Cobalt-carbon bond dissociation energy of coenzyme B_{12}. J Amer Chem Soc 1984; 106:8317

46. H. Flohr, N. Paunhorst, and J. Rétey. Synthesis, structure determination, and rearrangement of a model for the active site of methylmalonyl-CoA mutase with incorporated substrate. Angew Chem Int Ed Engl 1976; 15:561

47. J.M. Wood, Biological cycles for toxic elements in the environment, Science 1974; 183:1049

48. J.S. Thayer, Teaching bio-organometal chemistry, Ⅰ. The metals, J Chem Educ 1977; 54:662

49. R. Breslow and C. McAllister, Intramolecular bifunctional catalysis of ester hydrolysis by metal ion and carboxylate in a carboxypeptidase model, J Amer Chem Soc 1971; 93:7096

50. D.A. Buckingham and J.P. Collman, Hydrolysis of N-terminal peptide bonds and amino acid derivatives by the β-hydroxoaquotriethylenetetramine cobalt(Ⅲ)ion, J Amer Chem Soc 1967; 89:1082

51. D.A. Buckingham, F.R. Keen, and A.M. Sargeson, Facile intramolecular hydrolysis of dipeptides and glycinamide, J Amer Chem Soc 1974; 96:4981

52. E. Kimura, Sequential hydrolysis of peptides with β-hydroxoaquotriethylenetetraminecobalt(Ⅲ) Ion, Inorg Chem 1974; 13:951

53. J.T. Rotruck, A.L. Pope, H.E. Ganther, Selenium; Biochemical role as a component of glutathione peroxidase, Science 1973; 179:588

54. D. Chiu, A.L. Tannel and M.M. Millard, Improved procedure for X-ray photoelectron spectroscopy of selenium-glutathione peroxidase and application to the rat liver, Arch Biochem Biophys 1977; 184:209

55. L.G. Liungdal and J.R. Andreesen, A component of active formate dehydrogenase from clostridium Thermoaceticm, FEBS Letters 1975; 54:279

56. H.E. Ganther, Scripta, 1975; 8A:75
J.R. Prohaska and H.E. Ganther, Glutathione peroxidase activity of glutathione-S-transferase purified from rat liver Biochem Biophys Res Comm 1977; 76:437

57. a. G.N. Schrauzer, D.A. White, and C.J. Schneider,

Cancer mortality correlation studies, Ⅱ. Statistical associations with dietary selenium intakes. Bioinorg Chem 1977; 7:23

b. R.J. Shamberger, S.A. Tytko, and C.E. Willis. Antioxidants and cancer. Arch Envion Health 1976; 231

58 J. Parizek, J. Kalonskova, A. Babicky, J. Benes, and L. Pavlik. In Trace Element Metabolismin Animals (Ed. W.G. Hoekstra). University Park Press, Baltimore, 1974; p119

59. M.N. Hughes. The Inorganic Chemistry of Biological Processes, John Wiley and Sons Ltd. 2nd Edition, 1981; p320

60. Selenium in Nutrition, Revised-Edition. National. Academy Press, Washington, D.C, 1983

61. (a) C.K. Chang and T.G. Traylor. Solution behavior of a synthetic myoglobin active site, J Amer Chem Soc 1973; 95:5810

(b) C.K. Chang and T.G. Traylor. Neighboring group effect in heme-carbon monoxide binding. J Amer Soc 1973; 95: 8475

(c) C.K. Chang and T.G. Traylor. Proximal base influence on the binding of oxygen and carbon monoxide to heme. J Amer Chem Soc 1973; 95:8477